

SÉRIE A, N° 3216.
N° D'ORDRE: 4088.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Philippe SENDEL

Sous-directeur de laboratoire au Collège de France.

Première thèse : RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LA
DIFFÉRENCIATION DES GERMES PLUMAIRES ET DU PIGMENT
DE LA PEAU DE L'EMBRYON DE POULET EN CULTURE « IN
VITRO ».

Deuxième thèse : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 3 mai 1958 devant la Commission d'examen.

MM. GRASSÉ *Président.*

MAY..... }
DEVILLERS..... } *Examineurs.*
WOLFF }

PARIS

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN (VI^e)

1958



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SÉRIE A, N° 3216.

N° D'ORDRE: 4088.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Philippe SENDEL

Sous-directeur de laboratoire au Collège de France.

Première thèse : RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LA
DIFFÉRENCIATION DES GERMES PLUMAIRES ET DU PIGMENT
DE LA PEAU DE L'EMBRYON DE POULET EN CULTURE « IN
VITRO ».

Deuxième thèse : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 3 mai 1958 devant la Commission d'examen.

MM. GRASSÉ *Président.*

MAY.....

DEVILLERS.....

WOLFF.....

} *Examineurs.*



PARIS

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN (VI^e)

1958

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Dojén J. PÉRÈS.

PROFESSEURS

MM.		MM.	
G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
FOCH	T Mécanique physique et expérimentale.	WIEMANN	T Chimie organique structurale.
PAUTHENIER	T Électrotechnique générale.	JACQUINOT	T Spectroscopie et Physique céleste.
DE BROGLIE	T Théories physiques.	VASSY	T Physique de l'atmosphère.
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
GARNIER	T Géométrie supérieure.	PRUVOST	T Géologie.
PÉRÈS	T Mécanique des fluides et applications.	AMIEL	T Chimie générale.
LAUGIER	T Physiologie générale.	HOCART	T Minéralogie.
M. CURIE	T Physique (S. P. C. N.).	J.-P. MATHIEU	T Physique (P. C. B.).
BARRABE	T Géologie structurale et Géologie appliquée.	COUTEAUX	T Biologie animale (P. C. B.).
G. DARMOIS	T Calcul des probabilités et Physique mathématique.	MAY	T Biologie animale (P. C. B.).
J. BOURCART	T Géographie physique et Géologie dynamique.	CHOQUET	T Calcul différentiel et intégral.
PLANTEFOL	T Botanique.	FELDMANN	T Biologie (P. C. B.).
GRASSÉ	T Évolution des êtres organisés.	GUINIER	T Physique générale.
PRÉVOST	T Chimie organique.	JOST	T Physiol. comp.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	FORTET	T Calcul des probabilités.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	SCHWARTZ	T Méthodes mathématiques de la Physique.
WYART	T Minéralogie.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
TEISSIER	T Zoologie.	MALAVARD	T Aviation.
MANGENOT	T Biologie végétale.	BRELOT	T Calcul différentiel.
P. AUGER	T Physique quantique et Relativité.	NORMANT	T Chimie organique.
MONNIER	T Physiologie des fonctions.	BÉNARD	T Chimie (P. C. B.).
PIVETEAU	T Paléontologie.	BUYAT	T Botanique (É. N. S.).
ROCARD	T Physique (É. N. S.).	DUGUE	T Statistiques mathématiques.
H. CARTAN	T Mathématiques (É. N. S.).	GÉLOSO	T Chimie (S. P. C. N.).
LAFITTE	T Chimie générale.	SOULAIRAC	T Psychophysologie.
FAVARD	T Mécanique générale.	ULRICH	T Physiologie végétale.
COULOMB	T Physique du Globe.	MARECHAL	T Optique théorique et appliquée.
M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale (S. P. C. N.).	KIRRMANN	T Théories chimiques.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	CHADEFAUD	T Botanique.
P. DRACH	T Zoologie.	DESTRIAU	T Physique (M. P. C.).
KASTLER	T Physique.	M ^{lle} LE BRETON	T Physiologie générale.
EPHROSSI	T Génétique.	SALEM	T Mathématiques générales.
WURMSER	T Biologie physico-chimique.	LELONG	T Mathématiques générales.
RIVIÈRE	T Géologie (S. P. C. N.).	DEVILLERS	T Anatomie et Histologie comparées.
GAUTHERET	T Biologie végétale (P. C. B.).	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
LUCAS	T Recherches physiques.	FRANÇON	T Physique (S. P. C. N.).
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	GLANGEAUD	T Géographie physique et Géologie dynamique.
ARNULF	T Optique appliquée.	GODEMENT	T Mathématiques (M. P. C.).
M. MORAND	T Physique.	PISOT	T Calcul des probabilités.
SOLEILLET	T Physique.	E. ROCH	T Géologie.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	SCHATZMANN	T Astrophysique.
DANJON	T Astronomie.	TERMIER	T Paléontologie stratigraphique.
LAPORTE	T Physique générale et Radio-activité.	ZAMANSKY	T Mathématiques générales.
JANET	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	JOLIOU	T Physique nucléaire et Radio-activité.
PETIT	T Biologie maritime.	LENNUIER	T Physique (P. C. B.).
QUENEY	T Météorologie et Dynamique atmosphérique.	RIZET	T Génétique.
GALLIEN	T Embryologie.	M ^{me} TONNELAT	T Théories physiques.
EICHORN	T Biologie végétale (P. C. B.).	DIXMIER	T Mathématiques (M. P. C.).
DE CUGNAC	T Biologie végétale (P. C. B.).	SOUCHAY	T Chimie générale.
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie physique.	AIGRAIN	T Physique (P. C. B.).
TRELLIER	T Physique du globe.	BRUSSET	T Chimie minérale.
L'HÉRITIER	T Génétique.	M. LÉVY	T Physique théorique.
GRIVET	T Radio-électricité.	LENORMANT	T Physiologie.
PONCIN	T Mécanique des fluides.	M ^{me} CHAIX	T Chimie biologique.
DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.	M ^{me} HUREL-PY	T Biologie végétale (P. C. B.).
QUELET	T Chimie organique.	PIAUX	T Chimie (P. C. B.).
CAGNIARD	T Géophysique appliquée.	BRUN	T Mécanique expérimentale des fluides.
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.	LEDERER	T Chimie biologique.
CUVILLIER	T Géologie structurale et Géologie appliquée.	M ^{me} DUBREIL-JACOTIN	T Mathématiques.
JUNG	T Pétrographie.	M ^{me} LE LONG-FERRAND	T Mathématiques (É. N. S.).
		BELLAIR	T Géologie (S. P. C. N.).
		COTTE	T Physique (M. P. C.).
		J.-E. DUBOIS	T Chimie (S. P. C. N.).
		LAMOTTE	T Zoologie (É. N. S.).
		LE ROLLAND	T Mécanique des fluides.
		MICHEL	T Chimie (S. P. C. N.).
		CLMER	T Énergétique générale.
		Etc...	

Secrétaire général Ch. MONIER.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LA DIFFÉRENCIATION DES GERMES PLUMAIRES ET DU PIGMENT DE LA PEAU DE L'EMBRYON DE POULET EN CULTURE *IN VITRO*

Philippe SENDEL

Sommaire.

INTRODUCTION.....	432
<i>Chapitre I.</i> — MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	434
<i>Chapitre II.</i> — COMPORTEMENT DE LA PEAU « IN VITRO ».....	439
Aperçu historique (439) ; A. Généralités et définition des stades (439) ; B. Comportement de la peau sur le milieu standard (442) ; C. Comportement de la peau sur milieux synthétiques (445) ; Conclusions (449).	
<i>Chapitre III.</i> — ANALYSE DE LA DIFFÉRENCIATION DE LA PEAU ET DE LA MORPHOGENÈSE DES GERMES PLUMAIRES.....	451
Aperçu historique (451) ; A. Différenciation des ébauches plumaires dermiques (451) ; B. Différenciation et croissance des germes plumaires (460) ; C. Action du derme et de l'épiderme de la région dorsale sur des tissus non plumigènes (471) ; Conclusions (477).	
<i>Chapitre IV.</i> — ÉTUDE DE LA PIGMENTATION DE LA PEAU CULTIVÉE SUR DES MILIEUX NATURELS ET SYNTHÉTIQUES.....	481
Aperçu historique (481) ; A. Race pigmentée (482) ; B. Race blanche (490) ; Conclusions (495).	
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	497
RÉSUMÉ.....	501
BIBLIOGRAPHIE.....	504
LÉGENDES DES PLANCHES.....	509

INTRODUCTION

La différenciation de la peau et de ses dérivés épidermiques commence chez l'Oiseau au cours de la première moitié de la vie embryonnaire. Les ébauches des plumes apparaissent, chez l'embryon de poulet, au cours du 7^e jour de l'incubation. Elles occupent presque toute la surface des téguments. Seules certaines aires bien délimitées présentent d'autres structures, telles que le bec, la crête, les écailles de la région du tarso-métatarse et des phalanges et les ongles des doigts de la patte.

L'étude du développement précoce de la peau de l'embryon de poulet, de la morphogénèse et de la pigmentation des germes plumaires m'a été confiée par mon maître, le professeur Étienne WOLFF. Ces recherches se placent dans le cadre général de l'organogénèse des structures spécialisées de l'embryon. Dans la chronologie de l'ontogénèse, elles se limitent à la phase du développement comprise entre le stade de l'ectoderme à une seule assise cellulaire du 5^e jour et le stade de la poussée des germes plumaires et des écailles entre le 7^e et le 13^e jour de l'incubation.

Il s'agissait de résoudre, d'une part, les problèmes morphogénétiques posés par la différenciation de la peau et de ses annexes, d'autre part, les problèmes physiologiques des besoins nutritifs de la croissance et de la pigmentation des germes plumaires.

La méthode de culture d'organes *in vitro* de Ét. WOLFF et K. HOFFEN (1952) offre la possibilité d'aborder aisément ces questions, car elle permet d'entretenir, hors de l'organisme, le développement normal de fragments de peau embryonnaire et de soumettre ces explants à des conditions expérimentales qu'il eût été très difficile, voire impossible, de réaliser sur l'embryon entier à l'intérieur de sa coquille.

En faisant varier la composition du milieu de culture, en remplaçant l'extrait embryonnaire du milieu naturel par des solutions chimiquement définies, on étudie, d'une manière générale, les besoins nutritifs de la peau en culture et, en particulier, l'action de certains acides aminés sur la survie de la peau et sur la croissance et la pigmentation des germes plumaires. On détermine ainsi, parmi les substances étudiées, celles qui favorisent ou inhibent les différenciations tégumentaires et celles qui sont indispensables à la survie des fragments de peau.

Du point de vue morphogénétique, la méthode de culture d'organes permet de mettre en évidence les facteurs intervenant dans l'histogénèse des deux constituants de la peau, le derme et l'épiderme, et de préciser le rôle du derme et de l'épiderme dans l'édification du germe plumeux et de l'écaille.

L'exposé des résultats obtenus comporte trois parties.

Dans la première partie (chap. II), qui sert, en quelque sorte, d'introduction aux deux suivantes, j'étudie le comportement et les besoins nutritifs, en culture *in vitro*, des fragments de peau prélevés à différents stades du développement et explantés sur un milieu naturel et sur divers milieux synthétiques.

La seconde partie (chap. III) comprend les expériences qui démontrent et caractérisent l'activité du derme et de l'épiderme au cours de la différenciation des germes plumaires et des écailles.

La troisième partie (chap. IV) contient les recherches sur la pigmentation de la peau *in vitro*. Les résultats montrent l'influence de diverses substances sur la mélanogénèse d'une race noire et d'une race blanche.

Je prends un grand plaisir à remercier ici mon maître, le professeur Étienne WOLFF. Son enseignement de Zoologie et d'Embryologie expérimentale à la Faculté des Sciences de Strasbourg affirma mon penchant pour les sciences biologiques. Lorsqu'en 1950 il

m'offrit le poste d'assistant de son laboratoire, il me donnait du même coup la possibilité de me consacrer, sous sa direction, à la recherche scientifique. A ses côtés, j'appris alors, jour après jour, les méthodes de l'expérimentation biologique. J'avais à ma disposition les belles techniques de l'embryologie expérimentale qui sont la richesse de son laboratoire. Je lui suis particulièrement reconnaissant de sa grande bienveillance à mon égard, des nombreux conseils et des multiples idées dont il sut enrichir chacun de nos fréquents entretiens. Il fut pour moi un guide attentif et stimulant sans qui mon travail n'eût pas abouti. Enfin, je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour l'estime qu'il me témoigna en me faisant nommer sous-directeur de son laboratoire du Collège de France. Pour tout cela et pour toutes les joies et les satisfactions qu'il me permit de tirer de son enseignement, je lui exprime aujourd'hui ma vive reconnaissance.

Je remercie également M. le professeur Pierre-P. GRASSÉ d'avoir bien voulu accepter la présidence de mon jury de thèse.

CHAPITRE PREMIER

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — Matériel.

Toutes les expériences ont été faites sur l'embryon de poulet. Pour l'étude du comportement de la peau *in vitro* et de la morphogenèse des germes plumaires, nous nous sommes adressés à la race Leghorn blanche. Nous avons utilisé cette même race et une race noire, la Noire d'Alsace, pour l'étude de la pigmentation de la peau.

B. — Méthodes.

1. — Cultures *in vitro*.

Les fragments de peau sont cultivés *in vitro* pendant 5 à 27 jours, selon la méthode de culture d'organes mise au point par Ét. WOLFF et K. HAFFEN (1952) et déjà utilisée pour la culture de la peau embryonnaire par N. LEPORI (1953).

a. — *Milieux naturels*. — Le milieu naturel le plus fréquemment employé pour les cultures de fragments de peau est le milieu « standard » (« St ») de Ét. WOLFF et K. HAFFEN (1952). Il a la composition suivante :

Gélose à 1 p. 100 préparée dans le liquide de Gey.....	7 gouttes.
Liquide de Tyrode (1)	3 —
Extrait embryonnaire dilué de moitié dans du liquide de Tyrode.....	3 —

D'autres milieux naturels ont été utilisés, en particulier pour la culture des fragments de peau très jeune. Nous nous sommes inspirés, pour leur élaboration, des besoins nutritifs de la syrinx embryonnaire indifférenciée [Ét. WOLFF et Ém. WOLFF (1952) et Ém. WOLFF (1957 a)] et du tibia cartilagineux de 6 jours d'incubation (M. KIENY, 1958). Dans la composition de ces milieux entrent des liquides organiques adultes, tels que le plasma de poulet et le sérum de cheval, qu'on substitue ou ajoute à l'extrait embryonnaire du milieu standard. En voici la nomenclature et la composition :

Milieu PA : Gélose à 1 p. 100 préparée dans le liquide de Gey	7 gouttes.
Liquide de Tyrode (1).....	1 goutte.
Extrait d'embryons de poulet de 9 jours dilué de moitié dans le liquide de Tyrode	3 gouttes.
Plasma de poulet Difco (2)	2 —

(1) On ajoute, à la solution de Tyrode, de la pénicilline G (sel de Na) en solution dans le « Subtosan » Spécia à la dose de 10 unités Oxford par milieu de culture.

(2) Laboratoires Difco, Detroit, Michigan, U. S. A.

Milieu PB : Gélose à 1 p. 100	7 gouttes.
Liquide de Tyrode.....	3 —
Plasma de poulet Difco	3 —
Milieu SA : Gélose à 1 p. 100	7 gouttes.
Liquide de Tyrode.....	1 goutte.
Extrait d'embryons de poulet.....	3 gouttes.
Sérum de cheval Difco (1).....	2 —
Milieu SB : Gélose à 1 p. 100	7 gouttes.
Liquide de Tyrode.....	3 —
Sérum de cheval Difco.....	3 —

Les milieux PA et SA sont des milieux standard dans lesquels les deux tiers du liquide de Tyrode sont remplacés respectivement par du plasma de poulet et du sérum de cheval. Ces milieux sont quantitativement plus riches en liquides organiques que le milieu standard.

Les milieux PB et SB sont des milieux standard dans lesquels l'extrait embryonnaire est remplacé en totalité respectivement par le plasma de poulet et le sérum de cheval.

Précisons encore que, pour la préparation des milieux naturels, l'extrait embryonnaire est obtenu à partir d'embryons de poulet de la race Leghorn blanche de 9 jours d'incubation, sauf indications contraires.

b. — **Milieux synthétiques.** — Les milieux synthétiques sont préparés selon la méthode décrite par Ét. WOLFF (1953), K. STENGER-HAFFEN (1957), Ém. WOLFF (1957 b) et M. KIENY (1958).

1. **MILIEUX SYNTHÉTIQUES SANS ACIDES AMINÉS.** — Le milieu synthétique le plus simple est le milieu T de ces auteurs, contenant uniquement la solution de gélose à 1 p. 100 dans le liquide de Gey et la solution de Tyrode, dans les proportions suivantes :

Gélose à 1 p. 100.....	9 gouttes.
Liquide de Tyrode (2)	6 —

La concentration du glucose dans le milieu T est de 1 p. 1 000.

Deux autres milieux synthétiques ne contenant pas d'acides aminés, milieux T' et T₀, ont également été employés. Le milieu T' contient du glucose à la concentration de 0,6 p. 1 000. Le milieu T₀ ne renferme aucun glucide.

2. **MILIEUX SYNTHÉTIQUES CONTENANT DES ACIDES AMINÉS.** — Les acides aminés qui sont incorporés à la solution de Tyrode sont ceux contenus dans la solution B de Ét. WOLFF (1953). Ce sont, les quantités étant exprimées pour 100 cm³ de liquide de Tyrode (3) :

L (+)-lysine, 2 HCl	60,4 mg
L (+)-arginine base.....	30,8 —
DL-méthionine	10,4 —
DL-histidine, HCl	12,4 —
acide L (+)-glutamique	56,4 —
acide DL-aspartique.....	23,6 —
L (—)-proline	20,4 —
L (—)-cystéine, HCl	6,0 —
L (—)-tryptophane	20,0 —

(1) Laboratoires Difco, Detroit, Michigan, U. S. A.

(2) Le liquide de Tyrode contient de la pénicilline G (sel de Na) à raison de 10 unités Oxford par milieu de culture.

(3) Les acides aminés nous sont fournis par les Établissements Hoffmann-Laroche, Paris.

Ces acides aminés sont utilisés aux concentrations ci-dessus réduites, selon le cas, à 1/2, 1/6 ou 1/10.

Le milieu contenant les 9 acides aminés de la solution B est appelé milieu B. Les milieux synthétiques plus simples que le milieu B sont désignés par les initiales des acides aminés qui entrent dans leur composition, suivies de la fraction 1/2, 1/6 ou 1/10, selon la concentration utilisée : L pour lysine, A pour arginine, M pour méthionine, G pour acide glutamique, As pour acide aspartique, P pour proline, C pour cystéine et Tr pour tryptophane.

En outre, nous avons utilisé la L(—)-tyrosine (désignée par Ty) à des concentrations allant de 0,16 mg à 2 mg pour 100 cm³ de liquide de Tyrode.

2. — *Préparation des explants de peau.*

Toutes les opérations sont faites au stéréomicroscope Zeiss-Opton, à l'aide d'instruments de microchirurgie et d'ophtalmologie, dans les conditions d'asepsie usuelles.

a. — *Prélèvements des fragments de peau.* — Les fragments de peau (2 × 1,5 mm environ) sont prélevés dans la région dorsale comprise entre la base des ailes et la base de la queue de l'embryon, âgé de 5 à 8 jours 1/2 d'incubation.

Sauf indication contraire, ils sont toujours découpés de part et d'autre de la ligne médiane dorsale, une ou deux paires dans la région lombaire et, éventuellement, lorsque la taille de l'embryon le permet, une autre paire dans la région thoracique. L'un des fragments de chaque paire sert de témoin à son partenaire controlatéral.

L'on prend soin, lors de l'incision sur la ligne médiodorsale, de bien séparer deux fragments parfaitement équivalents. Lorsque les ébauches plumaires sont déjà visibles dans la peau, il est relativement facile de mener l'incision de telle sorte qu'elle coupe en deux parties égales les ébauches de la rangée médiodorsale. Dans le cas d'embryons plus jeunes, ne présentant aucune indication d'ébauches plumaires, la détermination de la ligne médiodorsale est plus difficile. Toutefois, il est possible de prendre repère sur la ligne de suture du tube neural qu'on aperçoit par transparence.

b. — *Dissociation des fragments de peau.* — La méthode à la trypsine diluée élaborée par A. MOSCONA (1952) et utilisée par de nombreux auteurs [J. P. TRINKAUS et P. W. GROVES (1955), E. ZWILLING (1955), C. GROBSTEIN (1955 a)], s'est révélée, après de légères modifications, une technique de choix pour séparer les deux composants de la peau, le derme et l'épiderme.

Des solutions de 0,1 p. 100 à 1 p. 100 de trypsine Difco 1 : 250 (1) dans le liquide de Tyrode donnent les meilleurs résultats : elles ne sont pas toxiques et permettent une dissociation parfaite de la peau, comme il sera précisé au chapitre III.

Les fragments y séjournent pendant 5 minutes à 38° C. Dans de nombreux cas, nous avons ajouté, comme E. ZWILLING (1955), 150 unités R. T. d'hyaluronidase Fluka (2) à 50 cm³ de solution de trypsine, pour éviter la formation d'une trop grande quantité de mucus qui gêne la manipulation et la culture des explants.

Après leur passage dans la solution de trypsine, les fragments de peau sont lavés pendant 5 minutes dans 3 bains successifs de liquide de Tyrode à 38° C.

On détache ensuite facilement l'épiderme du derme à l'aide d'un microscalpel. Il n'est pas rare, d'ailleurs, de pouvoir recueillir, sans les abîmer, le derme et l'épiderme d'un même fragment de peau.

(1) Laboratoires Difco, Detroit, Michigan, U. S. A.

(2) Fluka, A. G., Chemische Fabrik, Buchs SG, Suisse.

3. — *Mesures.*

a. — **Morphogenèse.** — Dans la majorité des expériences, les germes plumaires, au moment de l'explantation, ne sont pas encore différenciés ou ont une longueur inappréciable (inférieure à 0,02 mm).

À la fin de la culture et éventuellement en cours de culture, les germes plumaires sont comptés et la taille du plus grand est mesurée à l'aide d'un micromètre oculaire gradué à 0,025 mm.

b. — **Pigmentation.** — Pour apprécier le degré de pigmentation d'un fragment de peau, on compte au microscope, à l'aide d'un oculaire à champ quadrillé, le nombre de mélanocytes (1) du germe le plus pigmenté, après éclaircissement du fragment au benzène et montage dans le baume du Canada. Le degré de pigmentation est exprimé en nombre de mélanocytes par germe plumaire.

Ce comptage, très précis et simple dans le cas des fragments peu ou moyennement pigmentés, devient fastidieux pour les germes plumaires chargés de très nombreux mélanocytes (plus de 200).

Il est alors plus rapide de procéder de la manière suivante : on compare l'intensité de pigmentation du germe à une échelle préalablement établie avec des germes plumaires de peau dorsale d'embryons de la race Noire d'Alsace prélevée à différents âges, allant du stade 31 au stade 38 de V. HAMBURGER et H. L. HAMILTON (1951). Les germes plumaires de cette échelle, rangés selon leurs tailles croissantes, définissent chacun un degré de pigmentation A, B, C, ... (voir plus bas) qui correspond, après comptage, à un nombre défini de mélanocytes par germe plumaire.

L'échelle de pigmentation ainsi établie comporte 14 degrés de pigmentation :

A.....	0	mélanocyte par germe.
B.....	20	mélanocytes par germe.
C.....	49	—
D.....	110	—
E.....	139 ± 3	—
F.....	173 ± 5	—
G.....	300 ± 14	—
H.....	428 ± 25	—
J.....	610 ± 41	—
K.....	901 ± 60	—
L.....	1 383 ± 111	—
M.....	1 623 ± 130	—
N.....	1 961 ± 165	—
P.....	2 378 ± 251	—

De nombreuses vérifications par comptage direct ont montré que deux germes qui apparaissent également pigmentés à l'œil renferment, à 20 p. 100 près, le même nombre de mélanocytes. Lorsque la pigmentation d'un germe plumaire est à la fois plus intense que celle d'un germe donné de l'échelle et moins intense que celle du germe suivant, on admet que le nombre de mélanocytes qu'il comporte est la moyenne arithmétique des deux degrés de pigmentations consécutifs qui l'encadrent. Là encore, l'erreur commise ne dépasse pas 20 p. 100.

(1) J'emploie, dans ce travail, la terminologie des cellules pigmentaires préconisée par T. B. FITZPATRICK et A. B. LERNER (1953), qui a été adoptée par le « National Research Council. Committee on Pathology, Subcommittee on Oncology » et utilisée par les collaborateurs de *Pigment Cell Growth*, édité par M. GORDON (1953), Academic Press, New York. *Mélanocyte* désigne la cellule différenciée ou en voie de différenciation chargée de granulations de mélanine ; *mélanoblaste* désigne la cellule immature non encore pigmentée, mais capable de synthétiser la mélanine.

4. — *Microscopie.*

a. — *Montage in toto des fragments de peau.* — Pour la conservation, l'observation et le comptage des mélanocytes, les fragments de peau sont éclaircis au benzène, après coloration ou non à l'érythrosine Merck (1), et montés, entre lame à concavité et lamelle, dans le baume du Canada.

b. — *Techniques histologiques.* — Pour l'étude histologique, les fragments de peau, inclus à la paraffine, sont coupés à 5 microns et colorés soit au glychémalun-éosine, soit à l'hématoxyline ferrique de Weigert ou de Regaud, soit enfin au bleu de toluidine.

(1) Laboratoires Merck, Darmstadt, Allemagne.

CHAPITRE II

COMPORTEMENT DE LA PEAU *IN VITRO*

APERÇU HISTORIQUE.

Les auteurs qui ont utilisé les méthodes d'explantation *in vitro* pour la culture de fragments de peau d'embryons d'oiseau sont assez peu nombreux.

O. KAPEL (1929) a cultivé des morceaux de germes plumaires de 12 à 15 jours d'incubation, sans obtenir de prolifération notable. C. CHAMPY (1933), après l'explantation de germes plumaires entiers ou fragmentés, n'observe pas de croissance de ses explants. F. ROSSI et E. BORGHESE (1935, *a* et *b*) ont explanté des germes plumaires de 7 à 17 jours d'incubation, isolés ou accompagnés de fragments de peau, qui ne poursuivent pas leur différenciation *in vitro*.

N. LEPORI (1953), utilisant la méthode de culture d'organes de Ét. WOLFF et K. HAFFEN (1952), obtient, sur milieux naturel et synthétiques, la différenciation des germes plumaires à partir de fragments prélevés à un stade indifférencié.

La méthode de culture en verre de montre de H.-B. FELL (1951) a été mise à profit par H.-B. FELL et E. MELLANBY (1953) pour l'étude de l'influence d'un excès de vitamine A sur la différenciation de l'épiderme. Reprenant cette même méthode, A. GROPP et I. HILWIG (1954) obtiennent le développement organotypique de fragments de peau explantés entre 7 et 11 jours d'incubation.

J. W. SAUNDERS, Jr., W. C. QUEVEDO, L. PIERRO et F. E. MORBECK (1955) observent une bonne différenciation du pigment de la peau cultivée sur milieux naturel et synthétiques, mais un faible développement des germes plumaires.

Enfin, H. L. HAMILTON et A. L. KONING (1956) étudient l'action d'un inhibiteur de la phosphatase alcaline sur la croissance des germes plumaires *in vitro*. Ils constatent que l'absence d'activité phosphatasique empêche la différenciation normale des germes.

A. — Généralités et définition des stades.

Le comportement et le développement des fragments de peau explantés *in vitro* dépendent essentiellement du stade des explants au moment de la mise en culture.

D'une manière générale, le fragment de peau conserve *in vitro* une structure organisée harmonieuse, à condition qu'il ne soit pas prélevé à un stade trop précoce. Il se développe d'autant mieux qu'il est plus avancé au moment de l'explantation.

Il est nécessaire, pour situer les divers stades de la différenciation de la peau, de se reporter aux descriptions très complètes du développement du tégument des Oiseaux qu'ont données H. R. DAVIES (1889) et O. KUHN (1933), et à celles de l'apparition et de la disposition des germes plumaires, faites par A. HOLMES (1935), A. GERBER (1939) et V. HAMBURGER et H. L. HAMILTON (1951).

Je me bornerai à rappeler l'essentiel des modifications externes et histologiques que subit la peau au cours de son développement précoce, c'est-à-dire de 5 jours à 8 jours 1/2 d'incubation.

1. Développement de la peau entre 5 et 8 jours 1/2 d'incubation.

--- A 5 jours d'incubation, l'embryon est recouvert d'un ectoderme constitué d'une seule assise cellulaire (fig. 29, Pl. I). Au cours du sixième jour, l'ectoderme se différencie en épiderme à deux assises de cellules. En même temps, le derme se sépare progressivement du mésenchyme sous-jacent. La peau s'individualise.

Dès lors, la peau de la région dorsale est constituée d'un derme mésenchymateux à réseau lâche et d'un épiderme comprenant une assise profonde, l'épiderme proprement dit, composée de cellules hautes et cuboïdes, et une assise superficielle, le périoderme, formée de cellules aplaties à noyau allongé en fuseau parallèlement à la surface de la peau (fig. 30, Pl. I) (cf. E. A. BARTELS, 1943).

Jusqu'à la fin du septième jour d'incubation, l'épiderme reste plat et lisse. Les premières transformations qui précèdent la différenciation des germes plumaires ont leur siège dans le derme. Dès le début du septième jour, une trainée blanchâtre et opaque apparaît dans le derme sur la ligne médiodorsale de l'embryon. Elle s'étend du milieu du dos à la base de la queue. A. HOLMES lui a donné le nom de crête médiodorsale. Cette formation très éphémère correspond histologiquement à une condensation sous-épidermique des cellules du mésenchyme dermique. Elle se tronçonne bientôt en approximativement 22 petits amas de cellules dermiques qui, macroscopiquement, prennent l'aspect de petites taches rondes et opaques, les *ébauches plumaires*, tranchant nettement dans la peau translucide et alignées sur la ligne médiodorsale.

Ces petits agrégats de cellules sont l'élément mésodermique des ébauches plumaires. Nous convenons de les appeler les *ébauches plumaires dermiques* (fig. 31, Pl. I).

Vers la fin du septième et au début du huitième jour, de nouvelles ébauches plumaires apparaissent en rangées successives dans les régions dorsolatérales de l'embryon. Elles sont alignées en direction céphalo-caudale d'une manière sensiblement parallèle à la ligne médiane dorsale.

De plus, elles sont disposées en quinconce et approximativement équidistantes les unes des autres.

A mesure que de nouvelles rangées d'ébauches plumaires s'ajoutent aux précédentes, la rangée médiodorsale, puis les dorsolatérales, s'accompagnent progressivement d'un épaissement de l'épiderme sus-jacent, bientôt suivi de l'excroissance du jeune *germe plumaire* (fig. 32, Pl. I).

A 8 jours, les germes plumaires les plus avancés ont pris la forme de petites papilles cylindriques qui hérissent la surface de la peau et dont l'extrémité distale s'incline bientôt vers la queue de l'embryon. Le nombre des assises cellulaires de l'épiderme apical du germe est passé de 2 à 4 ou 5. La gaine ectodermique est remplie par les cellules dermiques constituant l'axe mésodermique du germe (fig. 33, Pl. I).

Au cours du développement ultérieur, les germes plumaires continueront à s'allonger considérablement jusqu'à atteindre plus d'un centimètre de long.

2. Définition des stades de la différenciation de la peau. — L'âge des fragments de peau, toujours découpés de part et d'autre de la ligne médiodorsale, est défini grossièrement par la durée d'incubation de l'embryon sur lequel ils sont prélevés. Mais l'examen attentif de la peau permet de distinguer trois stades précis de la différenciation des fragments.

a. *Stade indifférencié ou stade 0.* — Durée d'incubation comprise entre 5 jours $\frac{3}{4}$ et 6 jours $\frac{1}{2}$. Le derme est optiquement homogène. La crête dermique médiodorsale n'est pas encore visible ou sur le point d'apparaître. L'épiderme est plat (fig. 37, Pl. I).

b. *Stade des ébauches plumaires ou stade 1.* — Durée d'incubation comprise entre 6 jours $\frac{1}{2}$ et 7 jours. La peau présente, de part et d'autre de la rangée médiodorsale, 0, 1, 2 ou 3 rangées d'ébauches plumaires. L'épiderme est encore plat ou présente de très faibles excroissances qui n'atteignent pas 0,02 mm. Chaque fragment comporte donc 0, 1, 2 ou 3 rangées d'ébauches en plus de la demi-rangée médiodorsale (fig. 38, Pl. I).

c. *Stade des germes plumaires ou stade 2.* — Durée d'incubation comprise entre 7 et 8 jours $\frac{1}{2}$. La peau présente, de part et d'autre de la rangée médiodorsale, au moins 4 rangées d'ébauches plumaires qui commencent à s'exhausser. L'épiderme différencié compte de nombreux germes plumaires dont les plus longs sont alignés le long du bord médiodorsal du fragment. La taille des germes varie, selon l'âge de l'explant et l'emplacement qu'ils occupent sur le fragment, de 0,02 à 0,3 mm. Le stade 2 s'étendant sur une longue période, on peut, pour plus de précision, caractériser l'âge des fragments en indiquant, pour chacun d'eux, la taille du germe plumaire le plus long (fig. 39, Pl. I).

B. — Comportement de la peau sur le milieu standard.

Les fragments de peau se cultivent aisément pendant 15 à 25 jours, sans repiquage, ni lavage, sur le milieu standard à base d'extrait embryonnaire. La kératinisation de l'épiderme débute aux environs du dixième jour de culture pour un fragment de peau prélevé au huitième jour d'incubation.

Explants de peau de stade O $\left[5 \text{ jours } \frac{3}{4} \right]$.

Evolution de la surface de l'épiderme et du derme sur le milieu standard.

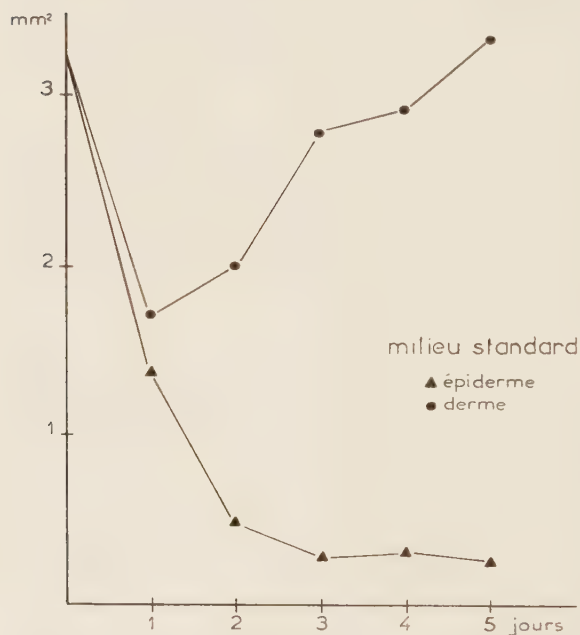


FIG. 1. — Évolution de la surface moyenne du derme et de l'épiderme de 19 fragments de peau, de stade 0, cultivés pendant 5 jours sur le milieu standard.

Le graphique (fig. 1) représente les variations moyennes de la surface du derme et de l'épiderme de 19 fragments de peau de stade 0 (5 jours $\frac{3}{4}$) en fonction de la durée de culture. La longueur et la largeur du derme et de l'épiderme sont mesurées au moment de l'explantation et après 1, 2, 3, 4 et 5 jours de culture.

Pendant les premières 24 heures, l'épiderme et le derme se contractent à peu près de la même manière, l'épiderme s'étrécissant toutefois un peu plus rapidement que le derme. (La surface de l'épiderme passe pendant ce premier jour de culture de 3,26 mm² à 1,39 mm², celle du derme de 3,26 mm² à 1,71 mm²).

La couche cornifiée s'épaissit progressivement à mesure que la culture se prolonge. En fin de culture, entre le vingt-cinquième et le vingt-septième jour d'explantation, la peau et les germes plumaires sont recouverts d'une importante couche de cellules kératinisées dont les assises superficielles commencent à se desquamer (fig. 34 et 35, Pl. I).

1. Contraction. — Les explants de peau se contractent considérablement pendant les premières 24 heures de culture, quel que soit leur stade au moment de l'explantation. La contraction est beaucoup plus importante pour les fragments de peau jeunes que pour les fragments plus âgés.

Dès le deuxième jour de culture, les comportements du derme et de l'épiderme divergent complètement. Ce dernier continue à s'étrécir jusqu'à la fin du troisième jour, après quoi sa surface reste à peu près stationnaire. En fin de culture, elle n'est plus que de 0,25 mm², soit environ treize fois plus petite qu'au départ. Le derme, par contre, s'étale progressivement sur le milieu et sa surface augmente rapidement, surtout pendant le troisième jour. A la fin du cinquième jour, le derme retrouve approximativement ses dimensions premières.

En fin de culture, la disproportion est énorme entre le derme et l'épiderme. Celui-ci ne recouvre plus qu'une très faible (la treizième environ) partie du derme. L'unité organique de l'explant s'en trouve détruite, avec toutes les conséquences que cela comporte pour l'organogenèse des germes plumaires.

Lorsqu'il s'agit de fragments de peau plus avancés dans leur différenciation (stade 1 ou 2), ces phénomènes se retrouvent, mais fortement atténués. La première contraction générale de l'explant est moindre. L'étrécissement de l'épiderme est beaucoup plus lent. Le derme ne s'étale que très peu à la surface du milieu. Ainsi les deux courbes de surface du derme et de l'épiderme ne divergent que faiblement. L'épiderme, dont la surface, en fin de culture, est toujours inférieure à celle du derme, en recouvre pourtant au moins le quart. L'intégrité de la peau n'est que peu ou pas altérée. Dans ces conditions, les germes plumaires ne manquent pas d'apparaître après quelques jours de culture (fig. 36, Pl. I).

2. Morphogenèse des germes plumaires in vitro. — a. *Explants de stade 0.* — Les fragments de peau de stade 0 ne développent, en général, pas de germes plumaires, lorsqu'ils sont explantés sur le milieu standard. La contraction de l'épiderme, très brutale, empêche toute morphogenèse (fig. 40, Pl. I). Dans certains cas, cependant, la contraction épidermique étant moindre (sans doute parce que le fragment de peau a légèrement dépassé le stade 0 au moment de l'explantation), quelques ébauches plumaires, rarement plus de 4 ou 5, se différencient dans la région du derme encore recouverte d'épiderme. Ces ébauches avortent pourtant et ne donnent pas naissance à des germes plumaires.

b. *Explants de stade 1.* — Les fragments de stade 1 présentent au plus trois rangées de six ébauches plumaires disposées parallèlement au bord médiodorsal. Elles occupent une bande longitudinale, plus ou moins large selon leur nombre, située du côté médiodorsal de l'explant.

Pendant les premières heures de culture, on voit leurs contours s'atténuer peu à peu. Après un jour, elles ont presque ou complètement disparu. Le fragment de peau est redevenu optiquement homogène. Il faut attendre la fin du deuxième, ou même le troisième jour, pour voir réapparaître d'autres ébauches plumaires, dont la disposition n'est plus celle du début. Elles sont toujours alignées en direction céphalo-caudale, mais d'une manière moins rigoureuse. Certaines d'entre elles sont disposées sans ordre.

Mais le fait le plus frappant est leur situation par rapport aux bords de l'explant. La première rangée qui se différencie apparaît approximativement au milieu de l'explant et non pas le long du bord médiodorsal, pourtant le plus avancé dans sa différenciation au départ. Les rangées suivantes se dessinent progressivement de part et d'autre de la nouvelle rangée médiane (fig. 41, Pl. I). Après 3 jours environ, les germes plumaires commencent leur excroissance, dans l'ordre d'apparition des ébauches. Leur taille et leur structure sont normales. Les plus longs d'entre eux atteignent, après 5 jours de culture, 0,3 mm. Leur nombre est environ d'une vingtaine (fig. 2).

Il se produit donc un complet remaniement au cours duquel la peau adapte la disposition de ses éléments dermiques à la topographie de l'explant. On assiste à un véritable processus de régulation : à partir d'une moitié droite ou gauche, il se reforme un tout symétrique. Le nouveau plan de symétrie bilatérale de l'explant a la même direction que celui de l'embryon. L'explant prend une structure qui s'équilibre de part et d'autre du nouveau plan de symétrie. Le fragment de peau devient une entité organique dont les différenciations s'organisent indépendamment de l'embryon dont il provient.

c. *Explants de stade 2*. — Les fragments de peau plus âgés de stade 2 ne subissent pas cette refonte dermique. Les germes plumaires dont la croissance est amorcée poursuivent leur développement. Les ébauches se transforment graduellement en germes plumaires. Dans ce cas, la disposition primitive des ébauches est respectée et, dans la grande majorité des cas, c'est la rangée située du côté médiodorsal de l'explant qui est la plus avancée (fig. 42, Pl. I). Le nombre des germes, après 5 jours de culture, est en moyenne de 35 ; leur taille dépasse souvent 0,4 mm.

Le nombre des germes plumaires, dans le cas des fragments de stade 1 et 2, est toujours inférieur au nombre de germes qu'aurait donnés la même surface de peau *in vivo*. Cette réduction s'explique aisément par la contraction des explants et par le fait que le diamètre et l'espacement des germes restent sensiblement les mêmes que chez l'embryon.

Au-delà de 5 jours de culture, les germes ne s'allongent plus guère. Il n'en apparaît plus de nouveaux. L'essentiel de leur développement se place entre 2 et 4 jours.

Au cours de nombreuses explantations de fragments de peau de race Leghorn blanche, nous avons constaté qu'environ la moitié des explants se pigmentent légèrement *in vitro*, alors que l'autre moitié reste dépourvue de mélanocytes. Le nombre des mélanocytes n'est jamais très élevé.

Dans le cas de fragments de peau de race noire (Noire d'Alsace), la différenciation des mélanocytes s'opère normalement *in vitro* et les germes plumaires se pigmentent d'une manière très intense (voir chap. IV).

C. — Comportement de la peau sur milieux synthétiques.

La plupart des expériences de culture de peau en milieux synthétiques sont faites sur des fragments de stade 1 (6 $\frac{3}{4}$ à 7 jours). Les fragments plus jeunes (stade 0) se cultivent très mal sur les milieux synthétiques : ils s'y désagrègent encore plus rapidement qu'ils le font sur le milieu standard.

1. Milieux ne contenant pas de substances quaternaires.

— a. Milieu T. — Sur le milieu synthétique T, contenant uniquement les solutions de Tyrode et de Gey gélifiées par de l'agar, les explants de peau ne survivent guère au-delà de 4 jours.

Malgré cette survie relativement courte, la différenciation des germes plumaires se fait normalement, à condition que le stade de l'explantation soit assez avancé.

La contraction des explants est très importante pour les stades jeunes (0,1), comme cela s'observe sur le milieu standard. Elle est bien moindre pour les stades plus tardifs (2).

Explantés au stade 0, les fragments ne se différencient pas et les germes plumaires n'apparaissent pas.

Dès le stade 1, il est possible d'obtenir la poussée des germes plumaires sur le milieu T, comme sur le milieu standard.

On observe, pour le stade 1, les mêmes phénomènes de dédifférenciation des ébauches plumaires, suivie du remaniement du derme et de la redifférenciation de nouvelles ébauches disposées de part et d'autre d'une nouvelle rangée médiane. La refonte des éléments dermiques, sur le milieu T, se fait plus lentement que sur le milieu standard. Elle dure de 48 à 72 heures. En outre, le nombre et la taille des germes plumaires, au bout de 5 jours de culture, sont toujours plus faibles sur le milieu T que sur le milieu standard (fig. 2).

Explants de peau de stade 1. [6 jours $\frac{3}{4}$].

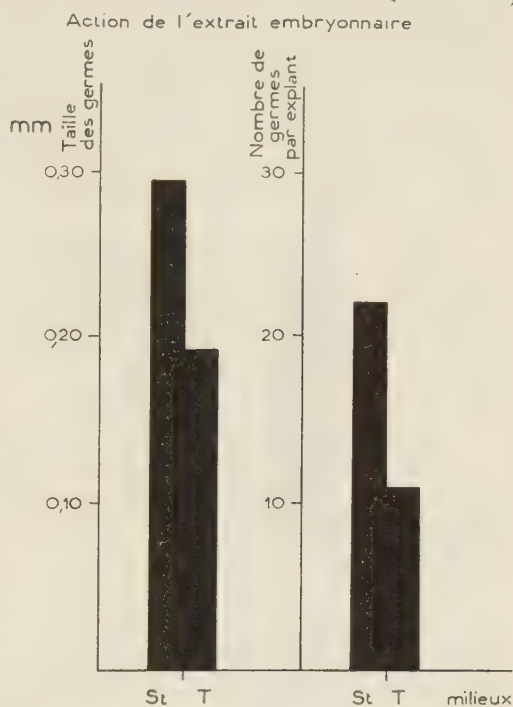


FIG. 2. — Comparaison de la taille et du nombre des germes plumaires de 32 paires d'explants contrôlatéraux, cultivés pendant 5 jours sur les milieux standard (St) et T.

Explantée au stade 2, la peau continue son développement normal sur le milieu T. La taille et le nombre des germes plumaires restent ici encore inférieurs aux valeurs obtenues sur le milieu standard. Les germes sont, en fin de culture, d'autant plus grands et plus nombreux qu'ils étaient plus grands et plus nombreux au départ. Les chiffres obtenus s'échelonnent, pour les tailles, de 0,20 à 0,35 mm, pour les nombres, de 15 à 30 germes.

b. *Milieu T₀ (sans glucose)*. — L'absence de glucose dans le milieu T₀ est incompatible avec la survie des fragments de peau. Au bout de quelques heures d'implantation sur ce milieu, l'explant s'opacifie, ses bords s'effritent et se désagrègent. Il perd de nombreuses cellules et se nécrose. Cette observation rejoint celle de SPRATT (1949) sur les cultures de blastodermes et de Ét. WOLFF (1953), K. STENGER-HAFFEN (1957), Ém. WOLFF (1957, b) et M. KIENY (1958) sur les cultures de divers organes, tels que gonades, syrinx et tibias d'embryons d'Oiseaux.

c. *Milieu T' (glucosé à 0,6 p. 1 000)*. — Déjà la réduction de la teneur en glucose dans le milieu T' qui contient 0,6 p. 1 000 — au lieu de 1 p. 1 000 — de glucose est préjudiciable à la survie des explants de peau. Elle n'excède pas 12 heures et, s'il pousse quelques germes plumaires, ceux-ci ne dépassent pas 0,05 mm de long.

2. *Milieus contenant des substances quaternaires*. — a. *Milieu B*. — Le milieu B contient les neuf acides aminés de la solution B de Ét. WOLFF (voir chap. I). Les acides aminés sont utilisés aux concentrations indiquées au chapitre I réduites à 1/2, 1/6 ou 1/10 de leur valeur initiale (milieux B 1/2, B 1/6 et B 1/10).

Le milieu B (concentration des acides aminés non réduite) s'est révélé plus ou moins toxique pour les fragments de peau. Les cultures périssent après 1 ou 2 jours.

Les milieux B 1/2 et B 1/10, où les acides aminés figurent à des concentrations non toxiques, permettent une longue survie. 17 fragments de peau de stade 1 (6 3/4 à 7 jours) sont explantés sur le milieu B 1/10. Tous survivent jusqu'au sixième jour de culture, 14 d'entre eux jusqu'au septième jour, 11 jusqu'au huitième et 8 sont encore en bon état à la fin du neuvième jour de culture. Aucun des fragments témoins contralatéraux explantés sur le milieu T ne survit au-delà du cinquième jour de culture ; 9 d'entre eux ont péri dès la fin du quatrième jour. La survie des fragments de peau est donc notablement prolongée (environ doublée) sur le milieu B 1/10.

Par contre, la croissance des germes plumaires n'est pas améliorée en présence des acides aminés du milieu B (fig. 3). En effet, bien que les fragments cultivés sur le milieu B 1/10 restent en parfait état au-delà du cinquième jour et présentent, au bout de 8 jours, un aspect histologiquement sain (fig. 43, Pl. I), les germes plumaires cessent de croître en même temps que ceux des témoins cultivés sur le milieu T.

L'essentiel de la croissance des germes plumaires s'effectue, sur les deux milieux, entre le deuxième et le quatrième jour. Pour cette raison, la taille des germes plumaires en fin de culture est la même (sur T : 0,17 mm ; sur B 1/10 : 0,15 mm ; $0,2 < P < 0,3$) sur les deux milieux (fig. 3).

b. *Milieux plus simples que le milieu B.* — La suppression de l'acide aspartique, de la proline et du tryptophane dans le milieu B 1/10 conduit au milieu ACMGLH 1/10 qui a la même action favorable sur la survie des fragments de peau que le milieu B 1/10. En plus, la croissance des germes plumaires sur ce milieu ACMGLH 1/10 est quelque peu améliorée par rapport à celle que permet le milieu T. La taille moyenne des germes de 17 fragments, au bout de 8 jours de culture, est de 0,20 mm. Les germes des témoins controlatéraux, cultivés sur le milieu B 1/10, atteignent 0,16 mm seulement ($0,02 < P < 0,05$) (fig. 3). L'association acide aspartique, proline, tryptophane doit donc être considérée comme inhibitrice de la croissance des germes. Sur le milieu ACMGLH 1/10, la croissance se poursuit au-delà du quatrième jour de culture.

Au cours de nos recherches sur la pigmentation de la peau *in vitro* (voir chap. IV), nous avons explanté des fragments de peau de stades 1 et 2 sur de nombreux milieux synthétiques contenant 1, 2, 3, 4 ou 5 acides aminés. La composition de ces milieux correspond à toutes les combinaisons possibles des six acides aminés du milieu ACMGLH.

Parmi tous ces milieux, ceux qui contiennent la cystéine ont la même action favorable sur la survie et la croissance des germes plumaires que le milieu ACMGLH 1/10. En particulier, 18 fragments de peau de stade 1 sont cultivés sur un milieu contenant la cystéine comme seule source d'azote, le milieu C 1/10 (fig. 4). Ils survivent pendant 8 jours, leurs germes se développent et atteignent 0,20 mm de long en moyenne. Leur nombre moyen par explant est de 20. Les témoins controlatéraux cultivés sur le

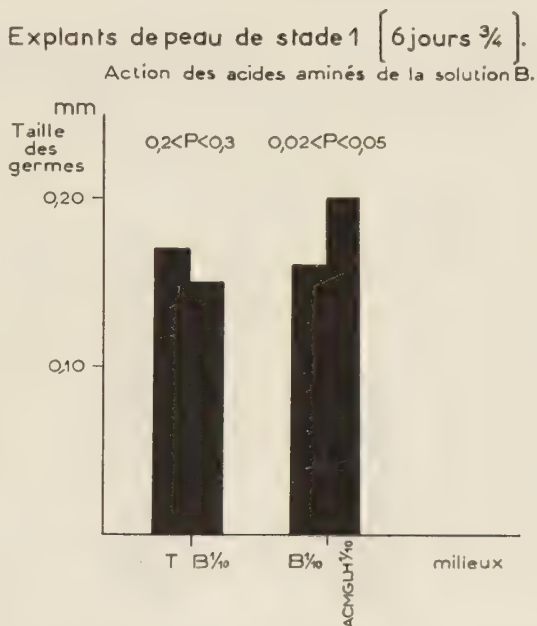


FIG. 3. — Comparaison de la taille des germes plumaires d'explants controlatéraux, cultivés pendant 5 jours ; d'une part, sur les milieux T et B 1/10 (17 paires d'explants) ; d'autre part, sur les milieux B 1/10 et ACMGLH 1/10 (17 paires d'explants).

milieu T ne peuvent être maintenus au-delà de 5 jours. Les germes plumeux, au nombre de 11 par explant en moyenne, mesurent, en fin de culture, 0,13 mm en moyenne ($P < 0,01$, pour les tailles et les nombres des germes).

Les milieux qui renferment la méthionine, à l'exclusion de la cystéine, permettent également une survie de 8 jours, mais n'ont aucune action sur la croissance des germes.

Les autres milieux, dépourvus à la fois de cystéine et de méthionine,

ne prolongent que faiblement la survie de la peau (5 à 6 jours), et n'agissent pas sur la croissance.

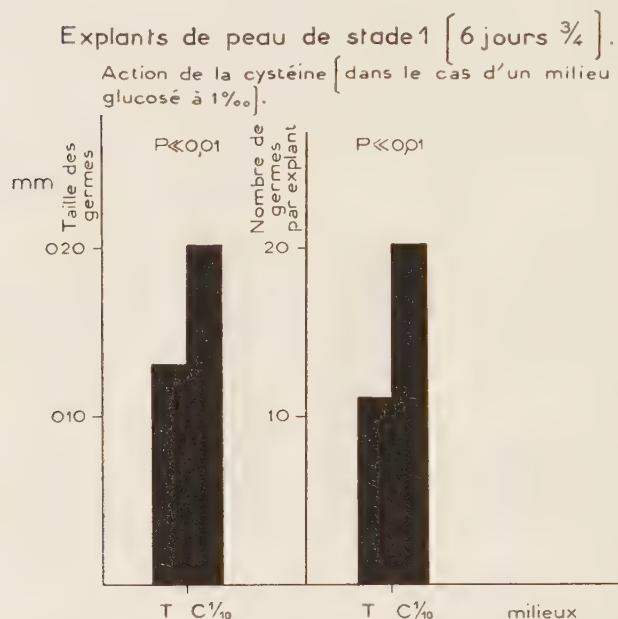


FIG. 4. — Comparaison de la taille et du nombre des germes plumeux de 18 paires de fragments de peau controlatéraux, cultivés pendant 5 jours sur les milieux T et C 1/10 (cystéine).

c. *Essai de remplacement du glucose par la cystéine.* — On a vu que la carence ou la déficience de glucose entraîne la nécrose des explants dès le premier jour de culture. Comme la cystéine a une influence très nette à la fois sur la survie et la morphogenèse des fragments de peau, nous nous sommes demandé si cet acide aminé est capable de pallier la carence ou la déficience du glucose.

Douze fragments de peau de stade 1 sont explantés sur un milieu contenant la cystéine à la concentration 1/10, mais dépourvu de glucose. Les témoins sont cultivés sur le milieu T₀. Sur les deux milieux, les explants se nécrosent, sans donner naissance à aucun germe. La cystéine est donc incapable de remplacer le glucose. En l'absence de glucose, les fragments ne peuvent pas utiliser la cystéine.

Dans une autre série expérimentale, l'action de la cystéine est éprouvée en la présence d'une faible teneur de glucose (0,6 p. 1 000) sur le milieu C' 1/10. Dans ce cas, les 11 fragments explantés sur le milieu contenant la cystéine survivent pendant 5 jours et 9 d'entre eux se couvrent de germes plumeux de 0,13 mm de long en moyenne. Leur nombre moyen est de 8 par explant. Parmi les témoins explantés sur le milieu T', 6 se nécrosent au bout de 12 heures. Les 5 autres se développent faiblement et acquièrent

en moyenne 2 germes de 0,04 mm (fig. 5) (tailles : $0,01 < P < 0,02$; nombres de germes : $0,05 < P < 0,1$).

La cystéine est donc capable de lever le préjudice porté par la déficience de glucose et permet d'obtenir des résultats comparables à ceux que donne le milieu T glucosé à 1 p. 1 000.

En définitive, la cystéine est un agent très important pour le maintien des fragments de peau en culture. En sa présence, la peau survit en moyenne pendant 8 jours et poursuit sa morphogenèse au-delà du quatrième jour de culture. Elle

n'est utilisée par les explants qu'en la présence de glucose. Sans hydrate de carbone, elle est tout à fait incapable d'enrayer la nécrose brutale. Pourtant, employée dans un milieu insuffisamment glucosé pour maintenir la peau en survie, la cystéine est à même de pallier cette déficience et d'entraîner une survie et un développement appréciables des fragments de peau.

K. HAFEN (1953) et

Ém. WOLFF (1953) ont

déjà mis en évidence, dans leurs expériences de culture de gonades et de syrinx d'embryons d'Oiseaux, le rôle très important, voire indispensable, de la cystéine.

Explants de peau de stade 1 [6 jours $\frac{3}{4}$].

Action de la cystéine [dans le cas d'un milieu glucosé à 0,6 ‰].

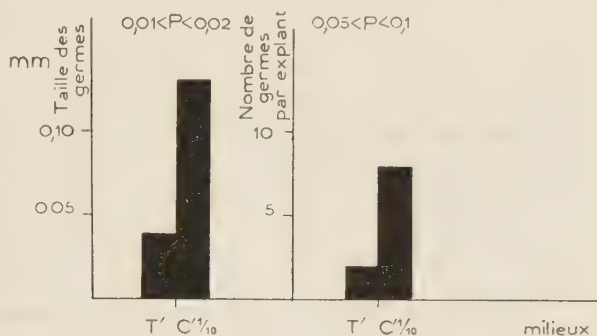


FIG. 5. — Comparaison de la taille et du nombre des germes plumaires de 11 paires de fragments de peau contrôlatéraux, cultivés pendant 5 jours sur les milieux T' et C' 1/10 (cystéine).

Conclusions.

Trois stades de la différenciation de la peau ont été définis.

Les fragments de peau en culture ont une tendance générale à se contracter d'autant plus qu'ils sont explantés plus précocement. Mais leur comportement et leur différenciation *in vitro* diffèrent selon le stade du prélèvement.

La peau de stade 0 (5 jours $\frac{3}{4}$) ne se différencie ni sur le milieu naturel standard, ni sur les milieux synthétiques éprouvés.

Explantée au stade 1 (6 jours $\frac{3}{4}$), la peau subit un remaniement de ses éléments dermiques qui précède l'apparition des ébauches et l'excroissance des germes plumaires. Les ébauches plumaires qui se différencient dans le derme s'organisent de part et d'autre d'une rangée d'ébauches

médiane qui occupe approximativement le plan de symétrie bilatérale de l'explant.

Explantée au stade 2 (7 jours 1/4 à 8 jours 1/2), la peau poursuit *in vitro* son développement normal, sans que la croissance des germes plumaires soit précédée d'une dédifférenciation des ébauches plumaires dermiques.

La survie des explants est en moyenne de 19 jours sur le milieu standard, de 4 jours sur le milieu T contenant 1 p. 1 000 de glucose.

La suppression du glucose ou la réduction à 0,6 p. 1 000 de sa teneur dans les milieux T₀ et T' entraîne la nécrose rapide des fragments de peau.

La cystéine prolonge la survie jusqu'à 8 jours, en la présence de 1 p. 1 000 de glucose. Utilisé dans un milieu à faible teneur de glucose (0,6 p. 1 000), cet acide aminé prolonge la survie jusqu'à 4 jours et permet d'obtenir la différenciation des germes plumaires. Il est incapable d'agir en l'absence totale de glucose. Les autres acides aminés étudiés n'améliorent pas la différenciation et la croissance des germes plumaires.

La peau se suffit donc à elle-même dès le moment où les premières ébauches plumaires sont apparues dans son derme. Avant ce stade, même le milieu naturel standard, à base d'extrait embryonnaire, est incapable d'apporter à la peau les éléments nécessaires à sa différenciation. On verra, dans le chapitre III, comment il faut enrichir le substrat de culture, pour obtenir cette différenciation à partir de la peau de stade 0.

Lorsque est franchie l'étape de la différenciation de ses ébauches plumaires, la peau n'a plus besoin d'apport azoté. Elle contient en elle les éléments qui lui permettent de poursuivre pendant quelques jours sa morphogenèse *in vitro*, à condition de trouver dans le milieu du glucose en quantité suffisante.

CHAPITRE III

ANALYSE DE LA DIFFÉRENCIATION DE LA PEAU ET DE LA MORPHOGENÈSE DES GERMES PLUMAIRES

APERÇU HISTORIQUE.

On trouve dans la littérature d'importants travaux sur le développement de la plume adulte et de sa régénération. Citons, en particulier, les analyses expérimentales de F.-R. LILLIE et H. WANG (1941, 1943), et de H. WANG (1943, 1944) qui mettent en évidence, d'une part, le rôle prépondérant de la zone dorsale de la papille, d'autre part, l'induction dermique fixant l'orientation et l'induction épidermique déterminant le caractère régional de la plume.

Il n'en est pas de même de la plume embryonnaire, le *germe plumaire*. Si l'on exclut les études purement descriptives de H. R. DAVIES (1889), O. KUHN (1933), A. HOLMES (1935), A. GERBER (1939) et R. L. WATTERSON (1942), il ne reste que les recherches de J. M. CAIRNS et J. W. SAUNDERS, Jr. (1954) et de J. W. SAUNDERS, Jr., M. T. GASSELING et J. M. CAIRNS (1955) qui montrent l'action du mésoderme sur la qualité de la différenciation des dérivés épidermiques de la peau.

A. — Différenciation des ébauches plumaires dermiques.

Les expériences du chapitre précédent ont montré que la peau très jeune de stade 0 est incapable de franchir le seuil de la différenciation des ébauches plumaires, lorsqu'elle est explantée sur le milieu standard, à base d'extrait embryonnaire. Il semble que les facteurs déterminant la formation des ébauches plumaires dermiques ne se trouvent ni dans la peau à ce stade précoce, ni dans l'extrait embryonnaire du milieu de culture.

Les expériences qui sont rapportées dans la première partie de ce chapitre ont pour but de rechercher les facteurs capables de provoquer dans la peau de stade 0 la différenciation des ébauches plumaires.

Une première catégorie d'expériences précise le rôle joué par des fragments d'organes embryonnaires, en particulier de tube neural, que l'on associe à la peau *in vitro*. Au lieu d'explanter le fragment de peau

directement sur le milieu, on réalise une sorte de culture « au deuxième degré » (Ét. WOLFF, 1956), dans laquelle la peau est déposée sur un fragment d'organe, lui-même explanté sur le milieu standard (P. SENDEL, 1957, a) (fig. 6).

Dans une deuxième catégorie d'expériences, le jus d'embryon du milieu standard est remplacé partiellement ou en totalité par du plasma de poulet ou du sérum de cheval dont on étudie le rôle sur la différenciation de la peau de stade 0.

1. Association de la peau de stade 0 avec des fragments d'organes embryonnaires. — Les fragments de peau de stade 0 sont toujours découpés

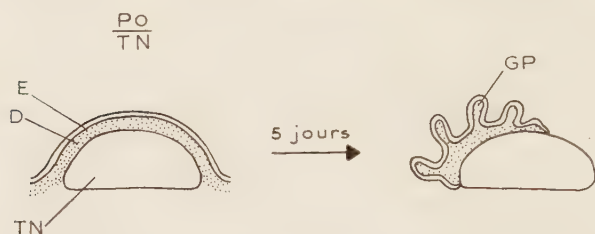


FIG. 6. — Évolution *in vitro* d'un fragment de peau, de stade 0 (P₀), explanté en association avec un fragment de tube neural (TN) : P₀/TN.

D, derme ; E, épiderme ; GP, germe plumaire ; TN, tube neural.

de part et d'autre de la ligne médiane dorsale. L'un des fragments est explanté sur le substrat organique, avec sa face dermique contre le fragment d'organe (fig. 6). L'autre fragment sert de témoin et est cultivé sur le milieu standard.

a. ASSOCIATIONS DE PEAU ET DE TUBE NEURAL. — Le tube neural

est prélevé sur des embryons de 5 jours 1/2 et de 7 jours 1/2 d'incubation. Il est fendu sagittalement en deux moitiés droite et gauche. Chaque moitié est tronçonnée en petits fragments d'environ 2 mm de long.

1. Tube neural de 5 jours 1/2. — Quatorze associations de peau de stade 0 et de tube neural de 5 jours 1/2 ont été explantées. L'une d'entre elles s'est dissociée dès le premier jour de culture ; la peau, ayant glissé et perdu le contact avec le tube neural, ne s'est pas différenciée. Les autres associations se sont maintenues. Au début du troisième jour de culture, des ébauches plumaires dermiques se dessinent dans les fragments de peau. Le quatrième jour, les premiers germes plumaires commencent à s'exhausser.

Le tableau n° I donne le nombre et la taille des germes plumaires qui se sont développés dans les treize associations, après 5 jours de culture. Le nombre moyen des germes est de 4 environ, la taille moyenne de 0,13 mm. Les quatorze témoins controlatéraux, cultivés sur le milieu standard sans tube neural, ne se sont pas différenciés. Leur derme est resté parfaitement homogène ; leur épiderme s'est contracté à l'extrême.

Il convient de remarquer que les fragments en association avec le tube neural se contractent également beaucoup, mais l'étrécissement propre de l'épiderme est très restreint par rapport aux témoins. Jusqu'à la fin de la culture, l'épiderme recouvre la presque totalité du derme.

TABLEAU I. — DIFFÉRENCIATION DE LA PEAU DE STADE 0
EN ASSOCIATION AVEC DU TUBE NEURAL DE 5 JOURS 1/2.

	FRAGMENTS ASSOCIÉS AU TUBE NEURAL.		FRAGMENTS TÉMOINS CULTIVÉS SEULS.
	<i>Nombre de germes.</i>	<i>Taille des germes en mm.</i>	<i>Nombre de germes.</i>
	2	0,07	0
	1	0,05	0
	4	0,12	0
	7	0,15	0
	1	0,10	0
	10	0,28	0
	3	0,10	0
	2	0,12	0
	4	0,10	0
	0	0	0
	7	0,20	0
	5	0,20	0
	4	0,20	0
Moyenne.....	3,8	0,13	0

TABLEAU II. — DIFFÉRENCIATION DE LA PEAU DE STADE 0
EN ASSOCIATION AVEC DU TUBE NEURAL DE 7 JOURS 1/2.

	FRAGMENTS ASSOCIÉS AU TUBE NEURAL.		FRAGMENTS TÉMOINS CULTIVÉS SEULS.	
	<i>Nombre de germes.</i>	<i>Taille des germes en mm.</i>	<i>Nombre de germes</i>	<i>Taille des germes en mm.</i>
	5	0,17	0	0,05
	0	0	0	
	5	0,27	0	
	10	0,25	1	
	13	0,30	0	
	6	0,20	0	
	10	0,30	0	
	4	0,20	0	
	6	0,25	0	
	6	0,22	0	
	4	0,01	0	
	1	0,05	0	
	13	0,27	0	
	5	0,28	0	
	3	0,20	0	
	9	0,25	0	
	12	0,30	0	
	3	0,10	0	
Moyenne.	6,4	0,20	0	

Le tube neural de 5 jours 1/2 exerce donc sur les fragments de peau une action morphogène très nette, mais assez faible. La taille et surtout le nombre des germes plumaires demeurent petits.

Est-il possible d'obtenir une meilleure différenciation et une croissance plus poussée avec des fragments de tube neural plus âgé ?

2. *Tube neural de 7 jours 1/2*. — Vingt associations de peau de stade 0 et de tube neural de 7 jours 1/2 sont réalisées. Deux d'entre elles échouent

Associations de peau de stade 0 { 5 jours 3/4 }
et de tube neural embryonnaire.

Influence de l'âge du tube neural.

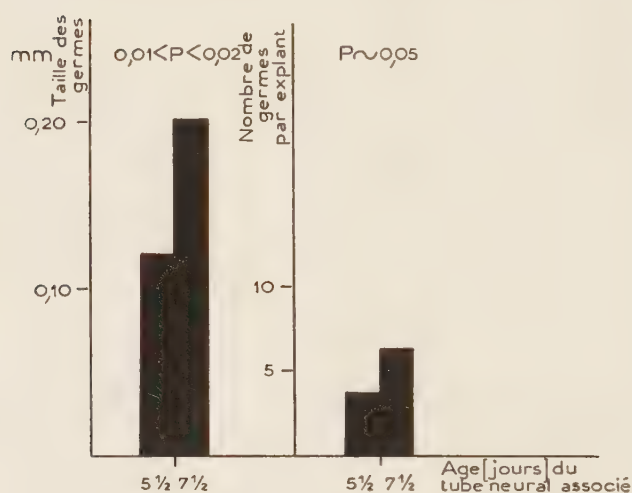


FIG. 7. — Comparaison de la taille et du nombre des germes plumaires de fragments de peau, explantés au stade 0 et cultivés en association avec des fragments de tube neural de 5 jours 1/2 (13 explants) et de 7 jours 1/2 d'incubation (18 explants.)

que celle du tube neural de 5 jours 1/2. L'analyse statistique des résultats de ces deux séries montre que les différences sont significatives, aussi bien pour le nombre des germes ($P \sim 0,05$) que pour leur taille ($0,01 < P < 0,02$).

b. ASSOCIATIONS DE PEAU ET D'AUTRES ORGANES EMBRYONNAIRES : MUSCLE CARDIAQUE, FOIE, INTESTIN, TOIT DU MÉSENCEPHALE, GONADE, MÉSONÉPHROS ET POU MON. — Les associations de peau de stade 0 et de fragments d'autres organes embryonnaires de 7 jours 1/2 d'incubation, tels que muscle cardiaque, foie, intestin, toit du mésencéphale, gonade, mésonéphros et poumon, ont donné les mêmes résultats que les associations de peau et de tube neural.

Dans tous les cas, les fragments de peau en association se sont couverts

par suite du glissement de la peau. Les dix-huit associations restantes sont cultivées pendant 5 jours. Le tableau n° II groupe les chiffres obtenus, en fin de culture. La moyenne des nombres de germes par explant dépasse 6, celle des tailles atteint 0,20 mm (fig. 44, Pl. I). Les témoins ne se sont pas différenciés (fig. 45, Pl. I), sauf un, qui a poussé un petit germe de 0,05 mm.

Il semble donc, comme le montre la figure 7, que l'action morphogène du tube neural de 7 jours 1/2 soit plus puissante

de germes plumaires, alors qu'aucun des témoins ne s'est différencié. Le nombre et la taille moyenne des germes plumaires après 5 jours de culture sont indiqués dans le tableau n° III pour chaque type d'association.

La différenciation des ébauches plumaires semble donc se produire sous l'influence d'un facteur non spécifique, commun à tous les organes éprouvés.

TABLEAU III. — DIFFÉRENCIATION DE LA PEAU DE STADE 0
EN ASSOCIATION AVEC DIVERS ORGANES DE 7 JOURS 1/2.

(Les témoins controlatéraux, cultivés seuls, ne se sont pas différenciés et ne figurent pas dans le tableau).

ASSOCIATION.	NOMBRE DE CAS.	NOMBRE MOYEN DE GERMES PAR EXPLANT.	TAILLE MOYENNE DES GERMES.
Peau + muscle cardiaque.	6	6	0,28
Peau + foie.	7	8	0,29
Peau + intestin.	4	5	0,19
Peau + toit du mésencéphale.	8	9	0,28
Peau + gonade.	5	5	0,26
Peau + mésonephros.	6	8	0,29
Peau + poumon.	6	8	0,24

c. EXPLANTATIONS DE PEAU DE STADE 0 SUR UN SUBSTRAT CONVEXE INERTE. — On peut se demander si la différenciation de la peau de stade 0, associée à d'autres organes, n'est pas due au simple fait de cultiver l'explant sur un substrat convexe, alors que les témoins sont sur un milieu plat. En d'autres termes, le rôle des organes associés ne peut-il se ramener à une banale action physique, à la tension de la peau, par exemple ?

Pour éprouver cette hypothèse, 8 fragments de peau de stade 0 sont explantés sur un coussin de gélose nutritive, de même composition que le milieu standard et mimant la forme d'un fragment de tube neural. Huit autres fragments sont cultivés sur un milieu standard fortement bombé. Les 16 témoins controlatéraux sont répartis en deux lots de 8, l'un est explanté sur des milieux standard plats, l'autre sur des fragments de tube neural.

Les résultats infirment l'hypothèse formulée : aucun des 16 fragments déposés sur coussin de gélose, ou sur milieu bombé, n'a poussé de germes plumaires ; seuls les 8 fragments du lot témoin, cultivés en association avec le tube neural, ont développé des germes.

d. ASSOCIATIONS DE PEAU DE STADE 0 AVEC DES FRAGMENTS DE TUBE NEURAL TUÉS A LA CHALEUR. — Le rôle du substrat organique doit donc être de nature chimique. La fonction morphogène des organes associés est-elle liée à leur activité métabolique ? Élaborent-ils, au cours de la culture, des substances capables de déclencher la différenciation des ébauches plumaires ?

Pour répondre à ces questions, les fragments de tube neural de 5 jours 3/4 d'incubation sont tués par la chaleur à 80° C par immersion pendant 10 mn dans du liquide de Tyrode non carbonaté. 14 fragments de peau de stade 0 sont explantés sur les morceaux de tube neural tués. Les témoins controlatéraux sont explantés seuls sur le milieu standard.

Douze des fragments de peau associés au tube neural tué se sont différenciés et ont acquis, au bout de 5 jours de culture, en moyenne, 7 germes plumaires par explant. Leur taille moyenne est de 0,18 mm (fig. 46 et 47, Pl. I). Les témoins sont tous restés indifférenciés.

Le tube neural tué à la chaleur conserve donc ses propriétés inductrices. Celles-ci ne sont pas liées à l'activité métabolique de l'organe associé.

Les organes de l'embryon de poulet de 5 jours 1/2 à 7 jours 1/2 d'incubation renferment donc une ou plusieurs substances, non destructibles à la température de 80° C, capables de déclencher dans la peau indifférenciée la formation des ébauches plumaires dermiques. Il s'agit vraisemblablement d'un facteur non spécifique, sous l'influence duquel le derme est capable de poursuivre, *in vitro*, sa morphogenèse normale. Il est curieux de constater que l'extrait embryonnaire, qui pourtant renferme l'extrait de tous les organes éprouvés, ne manifeste pas cette même activité.

2. Culture de la peau de stade 0 sur des milieux naturels contenant des liquides organiques adultes. — Dans ces expériences, réalisées au cours des mois d'avril et de mai, certains fragments de peau, pourtant prélevés à 5 jours 3/4 d'incubation et apparemment de stade 0, se sont différenciés et couverts de quelques germes plumaires, après l'explantation sur le milieu standard. Il est probable, comme l'a montré M. KIENY (1958) pour les tibias d'embryon de poulet, que la peau prélevée pendant les mois de printemps se cultive et se différencie plus facilement que celle prélevée en hiver. Bien que les fragments prélevés à 5 jours 3/4 d'incubation aient toujours le même aspect extérieur, au printemps comme en hiver, on peut penser que la peau de printemps a déjà atteint, au moment de l'explantation, un certain degré de différenciation non décelable à l'histologie.

a. MILIEUX NATURELS CONTENANT DU PLASMA DE POULET. — Nous avons réalisé deux sortes de milieux contenant du plasma de poulet (voir chap. I) :

1° Milieu PA, dans lequel le plasma de poulet est ajouté à l'extrait embryonnaire ;

2° *Milieu PB*, dans lequel l'extrait embryonnaire est totalement remplacé par le plasma.

L'activité morphogène de ces deux milieux sur des fragments de peau de stade 0 a été éprouvée dans deux séries expérimentales. Les témoins controlatéraux, dans les deux séries, sont explantés sur le milieu standard.

Première série : Le milieu PA s'est révélé un peu trop nutritif pour la culture des fragments de peau de stade 0. En effet, dès le premier jour de culture, on observe un essaimage massif des cellules dermiques. Celles-ci migrent en profondeur à travers le milieu et se regroupent à l'interface verre-milieu. Malgré une perte de matériel importante, les explants conservent sur le milieu PA une structure plus harmonieuse que sur le milieu standard.

La figure 8 représente l'évolution comparée des surfaces du derme et de l'épiderme sur les milieux PA et standard. Sur le milieu contenant le plasma de poulet, l'épiderme se contracte un peu moins que sur le milieu standard. A partir du deuxième jour de culture, le derme s'étale à la surface du milieu, très rapidement sur le milieu standard, modé-

rément sur le milieu PA. La disproportion entre la surface du derme et de l'épiderme est donc moindre sur le milieu PA que sur le milieu standard.

Vers la fin du deuxième jour de culture, sur le milieu PA, les ébauches plumaires apparaissent dans le derme. Au bout de 5 jours de culture, 7 explants sur 8 portent en moyenne 10 germes plumaires de 0,35 mm de long. 1 explant ne s'est pas différencié. Parmi les témoins, 4 n'ont pas poussé de germes plumaires, les 4 autres ont donné en moyenne 5 germes plumaires de 0,15 mm de long (fig. 48 et 53, Pl. II).

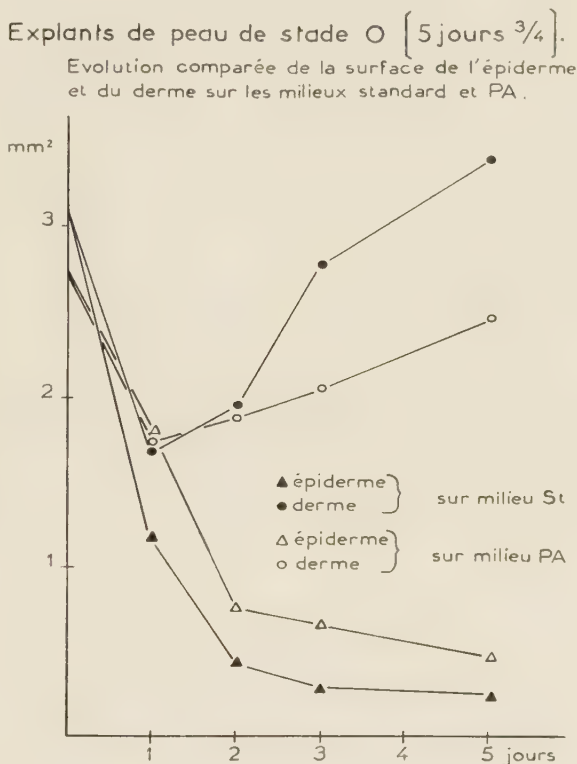


FIG. 8. — Évolution comparée de la surface du derme et de l'épiderme de 8 paires de fragments de peau controlatéraux, de stade 0, cultivés sur les milieux standard (St) et PA (contenant de l'extrait embryonnaire et du plasma de poulet).

L'action morphogène du plasma de poulet ajouté à l'extrait d'embryons est très nette : la différence entre les nombres et les tailles moyens des germes plumaires sur les deux milieux PA et standard est statistiquement très significative (P, pour le nombre de germes, $\sim 0,02$; P, pour la taille $< 0,01$).

Deuxième série : Sur le milieu PB, ne contenant pas d'extrait embryonnaire, l'essaimage des cellules dermiques est

beaucoup moindre. Il a uniquement lieu en surface comme sur le milieu standard. L'étrécissement de l'épiderme est aussi important sur le milieu PB que sur le milieu standard (fig. 9). Par contre, le derme, sur le milieu PB, continue à se contracter après un jour de culture, de sorte que l'intégrité de l'explant est beaucoup mieux conservée que sur les milieux standard et PA.

Tous les 14 fragments explantés sur le milieu PB se sont différenciés et ont acquis, après 5 jours de culture, en moyenne 16 germes de 0,30 mm de long. Parmi les témoins controlatéraux, 5 sont restés plats et indifférenciés, les 9 autres ont poussé, en moyenne,

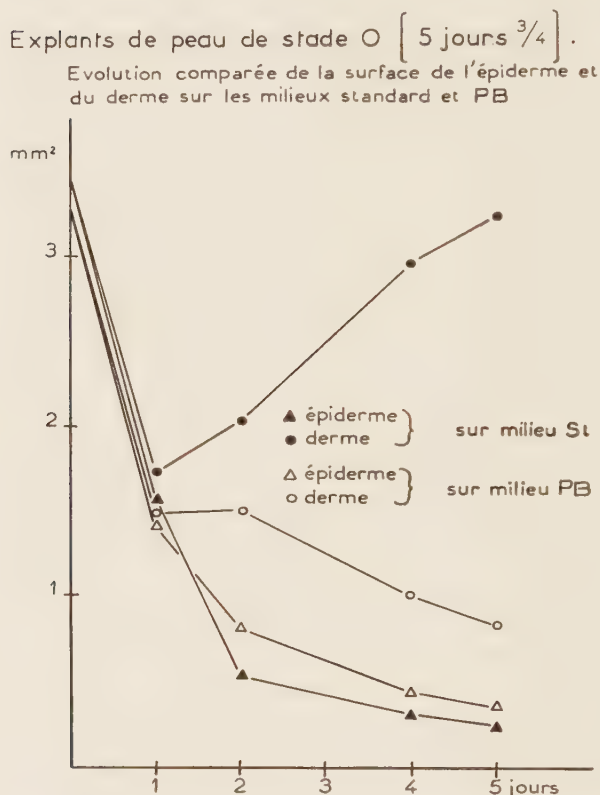


FIG. 9. — Évolution comparée de la surface du derme et de l'épiderme de 14 paires de fragments de peau controlatéraux, de stade 0, cultivés sur les milieux standard (St) et PB (contenant du plasma de poulet sans extrait embryonnaire).

7 germes de 0,20 mm de long (fig. 49, 51 et 52, Pl. II).

Ces expériences montrent que le plasma de poulet, employé seul, permet une différenciation des germes plumaires significativement plus importante que celle qu'on obtient avec l'extrait embryonnaire ($P < 0,01$, pour les tailles et les nombres de germes plumaires). Il est important de remarquer que la différence entre l'action du plasma et celle de l'extrait embryonnaire porte surtout sur le nombre des germes plumaires qui se développent sur un fragment. Non seulement le plasma de poulet stimule

la croissance des germes, mais surtout il induit dans le derme la formation d'un plus grand nombre d'ébauches plumaires.

b. MILIEUX NATURELS CONTENANT DU SÉRUM DE CHEVAL. — Nous avons étudié l'influence du sérum de cheval sur la différenciation de la peau de stade 0, comme nous l'avons fait pour le plasma de poulet. Deux milieux ont été élaborés :

1° *Milieu SA*, dans lequel le sérum de cheval est ajouté à l'extrait embryonnaire ;

2° *Milieu SB*, dans lequel le sérum de cheval est employé seul.

La figure 10 représente l'évolution comparée de la surface du derme et de l'épiderme sur les milieux SA et standard. Sur le milieu contenant du sérum de cheval, le derme ne s'étale pas à la surface du milieu et se contracte à peu près autant que l'épiderme. L'entité organique de l'explant est bien conservée, comme elle l'est sur le milieu PB contenant uniquement du plasma de poulet. Malgré cela, les fragments ne se différencient jamais en la présence de sérum de cheval, ni sur le milieu SA, ni sur le milieu SB (fig. 50, Pl. II).

En conclusion, la peau de stade 0 ne se différencie pas en l'absence de certains facteurs extérieurs. Ces derniers sont communs à de nombreux organes embryonnaires et au plasma de poulet. Ils font défaut à l'extrait d'embryons de poulet et au sérum de cheval. La peau, cultivée en association avec ces organes ou sur un milieu à base de plasma de poulet, poursuit sa morphogenèse normale. Ses cellules dermiques se condensent et forment les ébauches plumaires. Ét. WOLFF et M. KIENY (1956) ont

Explants de peau de stade 0 [5 jours $\frac{3}{4}$].

Evolution comparée de la surface de l'épiderme et du derme sur les milieux standard et SA.

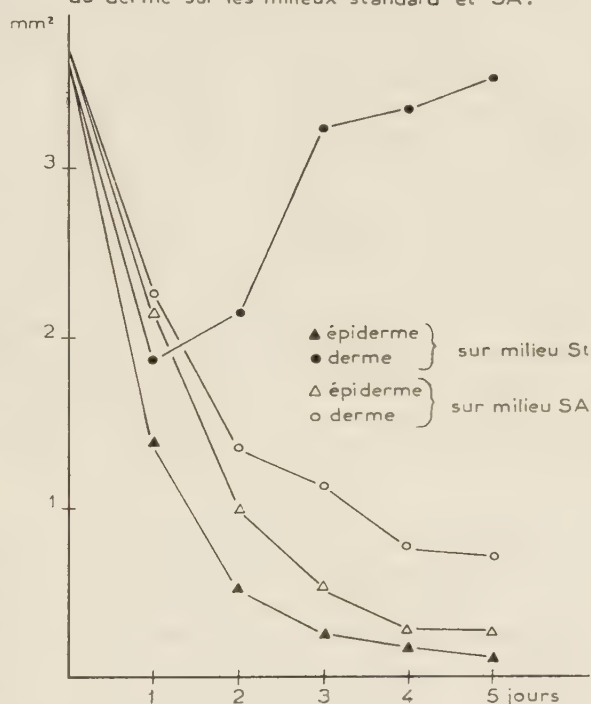


FIG. 10. — Évolution comparée de la surface du derme et de l'épiderme de 10 paires de fragments de peau controlatéraux, de stade 0, cultivés sur les milieux standard (St) et SA (contenant de l'extrait embryonnaire et du sérum de cheval).

montré de même que le plasma de poulet est indispensable pour obtenir *in vitro* la morphogenèse d'un tibia cartilagineux explanté à un stade très précoce.

Dans tous les cas où la différenciation de la peau se réalise, que ce soit en association avec d'autres organes ou en la présence de plasma de poulet, le derme des fragments ne s'étale pas à la surface du milieu et l'épiderme recouvre, pendant toute la culture, la plus grande partie du derme. On pouvait penser que le maintien de la structure normale de la peau *in vitro* était une condition suffisante à sa différenciation.

Or, on peut, par un artifice, conserver au fragment de peau de stade 0 son unité organique. Il suffit de réaliser une association E_0/D_0 (1), où le fragment d'épiderme (E_0) est environ deux fois plus long et deux fois plus large, au départ, que le fragment de derme (D_0). Dans ces conditions, l'épiderme s'étrécissant conserve une surface suffisante pour recouvrir la presque totalité du derme jusqu'à la fin de la culture. L'entité de la peau est préservée et, pourtant, aucune des dix associations de ce type n'a différencié de germes plumaires. Par ailleurs, sur les milieux contenant du sérum de cheval, les explants conservent également une structure compacte et harmonieuse, mais ne se différencient pas.

Il ne suffit pas, par conséquent, que l'explant de peau maintienne *in vitro* sa structure normale pour que sa différenciation s'effectue. Il semble que certaines substances passent du substrat au derme de la peau et y déclenchent la formation des ébauches plumaires. Le derme serait capable de réagir selon sa destinée normale à des agents, vraisemblablement non spécifiques, émanant des organes associés et du plasma de poulet.

B. — Différenciation et croissance des germes plumaires.

A sept jours d'incubation environ, l'ébauche plumaire est formée d'un petit agrégat de cellules dermiques surmonté d'une aire circulaire d'épiderme. Chacun de ses deux éléments, dermique et épidermique, contribue à l'édification du germe plumaire. L'ébauche épidermique multiplie le nombre de ses assises cellulaires et commence son excroissance en prenant l'aspect d'un petit dôme. Les cellules de l'ébauche dermique migrent à l'intérieur de la gaine épidermique, à mesure que le germe s'allonge.

Quel est le rôle de chacun des deux constituants de l'ébauche plumaire dans la différenciation et la croissance du germe plumaire ?

Pour répondre à cette question, nous avons séparé le derme de l'épiderme en faisant agir la trypsine diluée, selon la méthode mise au point par A. MOSCONA (1952). On peut ainsi réaliser *in vitro* des chimères « hétérochroniques » de peau constituées d'un fragment de derme et d'un fragment d'épiderme d'âges différents (P. SENDEL, 1956, 1957, *a* et *b*).

(1) On désigne par E_0 un fragment d'épiderme de stade 0 et par D_0 un fragment de derme de stade 0. Pour la séparation du derme et de l'épiderme, voir ci-dessous, § B.

Des expériences de contrôle ont montré que les explants ne souffrent pas de leur passage dans la solution de trypsine et que ce traitement n'a pas de répercussion sur leur développement ultérieur *in vitro*. En effet, un fragment de derme, réassocié, après séparation à la trypsine, avec son propre épiderme, se différencie *in vitro* sensiblement de la même manière qu'un fragment de peau témoin non trypsiné. La concentration relativement faible des bains de trypsine permet à la fois de séparer facilement l'épiderme du derme et de conserver intact le mésenchyme dermique.

La séparation est d'autant plus facile que les fragments de peau sont plus jeunes. Les photographies des figures 58 et 59, Pl. II, montrent l'aspect d'un fragment de peau de stade 2 (le plus difficile à dissocier) après le passage dans la solution de trypsine et le lavage dans le liquide de Tyrode. Toutes les cellules sont contractées et prennent un aspect arrondi. Il est facile de voir que la séparation du derme et de l'épiderme est parfaite, même avant toute intervention mécanique. La papille dermique des jeunes germes plumaires, bien qu'étant un point de plus forte adhérence, se détache du capuchon épidermique sans se déchirer. Tout au plus, reste-t-il quelques débris cellulaires (fig. 60, Pl. II) contre la face interne de l'épiderme.

Sauf indication contraire, chaque association de derme et d'épiderme est accompagnée de deux témoins : le témoin controlatéral du fragment donneur de derme et celui du fragment donneur d'épiderme. On est ainsi renseigné sur les potentialités propres de chacun des deux composants de l'association. Tous les explants sont cultivés sur le milieu standard.

1. Rôle du derme dans la différenciation des germes plumaires. — *Première série expérimentale.* — Pour mettre en évidence le rôle du derme dans l'édification du germe plumaire, nous avons réalisé des associations d'épiderme indifférencié de stade 0 (E_0) et de derme au stade des ébauches plumaires ou stade 1 (D_1) : E_0/D_1 (fig. 14).

Sur 12 associations E_0/D_1 cultivées pendant 5 jours, 11 se sont développées et ont acquis un nombre moyen voisin de 5 germes plumaires par explant (tableau n° IV). La taille moyenne des germes est de 0,30 mm (fig. 55, Pl. II). Les 11 témoins du derme E_1/D_1 ont poussé des germes sensiblement de la même taille, mais en nombre plus élevé (cf. fig. 41, Pl. I). Les 11 témoins de l'épiderme E_0/D_0 ont subi le sort commun à tous les explants de stade 0 (cf. fig. 40, Pl. I) : ni ébauche, ni germe, mais très forte contraction de l'épiderme. Les deux témoins de l'unique association qui ne s'est pas développée (dernière ligne du tableau IV) sont restés plats et indifférenciés.

Notons que l'évolution des associations du type E_0/D_1 est en tout point parallèle à celle d'un fragment de peau entière de stade 1. On observe la même disparition des ébauches au bout de quelques heures de culture, puis le même regroupement des ébauches au centre de l'explant, à partir

du troisième jour de culture. Il y a donc ici encore un complet remaniement des éléments dermiques.

Ces explantations mettent en évidence le rôle actif du derme. C'est, sans conteste, lui qui donne la première impulsion à l'excroissance des germes plumaires. L'épiderme indifférencié de stade 0, normalement inactif, est capable de répondre à ce qu'on peut appeler l'*induction dermique*.

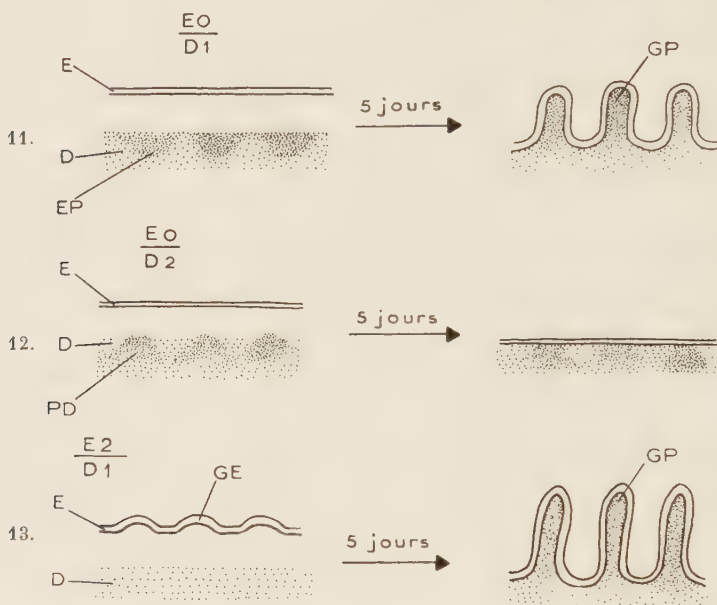


FIG. 11. — Évolution *in vitro* de l'association d'épiderme de stade 0 (E_0) et de derme de stade 1 (D_1) : E_0/D_1 .

FIG. 12. — Évolution *in vitro* de l'association d'épiderme de stade 0 (E_0) et de derme de stade 2 (D_2) : E_0/D_2 .

FIG. 13. — Évolution *in vitro* de l'association d'épiderme de stade 2 (E_2), et de derme de stade 0 (D_0) : E_2/D_0 .

D, derme ; E, épiderme ; EP, ébauche plumaire dermique ; GE, gaine épidermique d'un très jeune germe plumaire ; GP, germe plumaire ; PD, pulpe dermique d'un très jeune germe plumaire.

Quelle est la durée de cette induction ? S'exerce-t-elle pendant toute la croissance des germes plumaires ?

Deuxième série expérimentale. — Des expériences d'association d'épiderme indifférencié de stade 0 (E_0) et de derme au stade des germes plumaires ou stade 2 (D_2) : E_0/D_2 répondent aux questions qui viennent d'être posées (fig. 12).

Les fragments de derme de stade 2 possèdent au moins 4 rangées d'ébauches qui, pour la plupart, ont déjà la forme de petites excroissances atteignant 0,05 mm. En réalité, il s'agit déjà de l'axe mésodermique de très jeunes germes plumaires.

TABLEAU IV. — ÉVOLUTION APRÈS 5 JOURS DE CULTURE DES ASSOCIATIONS E_0/D_1 ET DE LEURS TÉMOINS E_1/D_1 ET E_0/D_0 .

	ASSOCIATION E_0/D_1 .		TÉMOIN DU DERME E_1/D_1 .		TÉMOIN DE L'ÉPIDERME E_0/D_0 .	
	Nombre de germes.	Taille des germes en mm.	Nombre de germes.	Taille des germes en mm.	Nombre de germes.	Taille des germes en mm.
	4	0,28	6	0,32	0	—
	7	0,30	4	0,32	0	—
	9	0,35	15	0,32	0	—
	2	0,20	20	0,35	0	—
	4	0,35	25	0,32	0	—
	4	0,20	4	0,30	0	—
	3	0,37	16	0,30	0	—
	6	0,30	12	0,35	0	—
	6	0,30	20	0,22	0	—
	4	0,32	32	0,25	0	—
	1	0,30	23	0,22	0	—
	[0	—	0	—	0	— (1)]
Moyenne.	4,5	0,30	16,1	0,30	0	

(1) Une association E_0/D_1 ne s'est pas développée. Noter que le témoin du derme E_1/D_1 est resté indifférencié, lui aussi. Il n'est pas tenu compte de ce cas pour le calcul de la moyenne.

Au bout de 5 jours de culture, 8 associations E_0/D_2 sur 10 sont restées indifférenciées. L'épiderme greffé n'a pas formé de capuchons épidermiques, il est resté plat. Les petites taches blanches des ébauches plumaires sont restées visibles dans le derme jusqu'à la fin de la culture (fig. 54, Pl. II). Leur état est demeuré stationnaire et elles n'ont pas donné naissance à des germes plumaires (tableau V).

Les deux associations restantes se sont différenciées et ont poussé des germes plumaires. Dans ces deux cas, les petits amas dermiques ont disparu après les premières 24 heures de culture, comme cela s'est produit dans les associations E_0/D_1 de la série précédente. Sans doute s'agissait-il encore, dans ces deux cas, de véritables ébauches dermiques n'ayant pas encore atteint le stade 2.

Tous les témoins E_2/D_2 se sont développés normalement en acquérant de nombreux germes dont les tailles se groupent autour de 0,38 mm (cf. fig. 42, Pl. I). Les témoins E_0/D_0 , sans exception, sont restés à l'état indifférencié (cf. fig. 40, Pl. I).

Il semble donc que, dès le stade des jeunes germes plumaires, le derme ait perdu son pouvoir inducteur et soit redevenu inactif. Il est intéressant de noter que la phase d'activité du derme correspond aux stades précoces de sa différenciation. Le derme conserverait son pouvoir inducteur tant que la concentration des cellules est réversible. Cette hypothèse est

TABLEAU V. — ÉVOLUTION APRÈS 5 JOURS DE CULTURE DES ASSOCIATIONS E_0/D_2 ET DE LEURS TÉMOINS E_2/D_2 ET E_0/D_0 .

	ASSOCIATION E_0/D_2 .		TÉMOIN DU DERME E_2/D_2 .		TÉMOIN DE L'ÉPIDERME E_0/D_0 .	
	Nombre de germes.	Taille des germes en mm.	Nombre de germes.	Taille des germes en mm.	Nombre de germes.	Taille des germes en mm.
	0	—	47	0,35	0	—
	0	—	51	0,35	0	—
	0	—	36	0,32	0	—
	0	—	39	0,48	0	—
	0	—	15	0,40	0	—
	0	—	12	0,42	0	—
	2	0,25	13	0,35	0	—
	3	0,40	18	0,40	0	—
	0	—	10	0,42	0	—
	0	—	20	0,32	0	—
Moyenne..	0,5	0,07	26,1	0,38	0	—

étayée par l'observation des deux associations de cette série expérimentale dans lesquelles le derme a subi le remaniement caractéristique des explants de stade 1 et chez lesquelles, précisément, la morphogenèse des germes plumaires a eu lieu. Le derme perd son pouvoir inducteur dès que les ébauches, commençant à croître, se fixent définitivement pour se transformer en germes plumaires.

Les résultats des deux séries expérimentales qui viennent d'être décrites montrent que le rôle du derme dans la différenciation précoce du germe plumaire se limite à une brève action inductrice sur l'épiderme, contemporaine de l'apparition des ébauches plumaires.

S'il en est ainsi, la tâche d'organiser la croissance des germes à partir de leurs ébauches revient-elle à l'épiderme ? Peut-on montrer que l'épiderme, différencié sous l'effet de l'induction dermique, est capable, à son tour, d'induire dans le derme la formation de germes plumaires ?

2. Rôle de l'épiderme dans la différenciation et la croissance des germes plumaires. — *Première série expérimentale.* — Pour démontrer le rôle organisateur de l'épiderme différencié, nous avons explanté des associations d'épiderme de stade 2 (E_2) et de derme indifférencié de stade 0 (D_0) : E_2/D_0 (fig. 13).

L'épiderme différencié est caractérisé par la présence sur sa face externe de 4, 5 ou 6 rangées de petites éminences hémisphériques alignées en direction céphalo-caudale. Ces faibles convexités correspondent chacune à la gaine épidermique d'un très jeune germe plumaire qui vient d'amorcer sa croissance.

TABLEAU VI. — ÉVOLUTION APRÈS 5 JOURS DE CULTURE DES ASSOCIATIONS E_2/D_0 ET DE LEURS TÉMOINS E_0/D_0 ET E_2/D_2 .

	ASSOCIATION E_2/D_0 .		TÉMOIN DU DERME E_0/D_0 .		TÉMOIN DE L'ÉPIDERME E_2/D_2 .	
	<i>Nombre de germes.</i>	<i>Taille des germes en mm.</i>	<i>Nombre de germes.</i>	<i>Taille des germes en mm.</i>	<i>Nombre de germes.</i>	<i>Taille des germes en mm.</i>
	12	0,33	0	—	25	0,40
	5	0,20	0	—	47	0,35
	5	0,25	0	—	51	0,35
	6	0,48	0	—	36	0,32
	12	0,20	0	—	43	0,30
	20	0,20	2	0,05	45	0,35
	2	0,05	0	—	47	0,22
	13	0,20	0	—	53	0,35
	5	0,15	0	—	48	0,32
	[0	—	0	—	0	— (1)]
Moyenne..	8,9	0,23	—	—	44,5	0,30

(1) Une association E_2/D_0 ne s'est pas différenciée. Son témoin E_2/D_2 est resté plat, lui aussi. Il n'est pas tenu compte de ce cas pour le calcul de la moyenne.

Le tableau VI groupe les résultats obtenus. Sur 10 associations E_2/D_0 , 8 se sont différenciées et ont acquis, au bout de 5 jours de culture, des germes plumaires bien formés (fig. 56 et 57, Pl. II). Leur disposition est plus ou moins anarchique. Leur taille moyenne est sensiblement la même que celle des germes qui ont poussé chez les témoins E_2/D_2 (cf. fig. 42, Pl. I). Leur nombre, au contraire, bien qu'assez élevé dans certains cas, reste nettement inférieur à celui des témoins E_2/D_2 . Il arrive fréquemment, lors de la séparation du derme et de l'épiderme de la peau de stade 2, qu'un certain nombre de jeunes excroissances épidermiques soient retournées en doigt de gant et forment ainsi des concavités sur la face externe de l'épiderme. Il est très probable que de tels capuchons inversés sont, sinon incapables de se développer normalement, du moins retardés dans leur évolution par rapport aux capuchons ayant conservé une orientation normale. Ces faits peuvent expliquer le nombre relativement restreint des germes qui poussent sur les associations.

L'une des associations E_2/D_0 (tableau VI) n'a donné naissance qu'à deux germes très petits et mal formés. Une autre ne s'est pas différenciée du tout; mais, dans ce dernier cas, le témoin E_2/D_2 , lui aussi, est resté plat sans acquérir de germes plumaires (dernière ligne du tableau VI).

Neuf témoins E_0/D_0 sur 10 ne se sont pas différenciés (cf. fig. 40, Pl. I). 1 témoin E_0/D_0 , ayant vraisemblablement quelque peu dépassé le stade 0, au moment de l'explantation, s'est faiblement développé en donnant naissance à 2 germes de 0,05 mm. Néanmoins, l'action de l'épiderme est

certaine dans l'association hétérochronique correspondante qui s'est couverte de 20 germes de 0,20 mm et a ainsi atteint un développement que ne lui permettait pas la seule influence dermique.

Il n'est donc pas douteux que l'épiderme joue, dans cette phase du développement, le rôle principal dans l'édification des germes plumaires. Ces derniers se développent à l'emplacement même des petites excroissances épidermiques du stade de départ. Il est permis de penser que ces très jeunes germes, en s'allongeant, induisent le derme à suivre le mouvement. Un fragment de derme indifférencié, n'ayant pas formé d'ébauches plumaires, est capable de répondre à l'action de l'épiderme et de garnir de ses jeunes cellules la gaine épidermique qui s'agrandit. Sous l'influence de l'épiderme, le derme est amené à se différencier bien avant le stade normal de sa différenciation.

Deuxième série expérimentale. — D'autres associations mettent en évidence le rôle inducteur de l'épiderme d'une manière peut-être plus saisissante.

Un fragment de peau de stade 1 est explanté avec sa face épidermique contre le milieu de culture (iP_1). Un fragment d'épiderme de stade 2 (E_2)



FIG. 14. — Évolution *in vitro* de l'association d'épiderme de stade 2 (E_2) et de peau inversée de stade 1 (iP_1) : E_2/iP_1 .

D , derme avec 3 ébauches plumaires ; Eg , épiderme greffe avec la gaine épidermique de 3 jeunes germes plumaires ; Ep , épiderme propre de la peau inversée ; GP , germe plumaire.

est ensuite déposé sur ce fragment de peau inversé avec sa face interne contre la face profonde du derme : E_2/iP_1 (fig. 14).

Ces associations (5 cas) se développent en une sorte de peau « dédoublée ». Les germes plumaires de la peau inversée se différencient normalement en poussant en direction du milieu de culture. Des germes plumaires induits secondairement par l'épiderme greffé recouvrent la face supérieure de l'explant (fig. 61 et 62, Pl. II).

Le derme se trouve plus ou moins divisé en deux parties par des lacunes situées au centre de l'explant (fig. 63 et 64, Pl. II). Approximativement une moitié du derme semble attirée par l'épiderme propre de la peau, l'autre moitié par l'épiderme greffé.

L'épiderme de stade 2 est donc capable d'induire la formation de germes plumaires dans une portion du derme qui, normalement, n'en forme pas. Les régions profondes du derme répondent comme les régions superficielles à l'influence épidermique.

3. *Rôle du derme dans la différenciation de l'ectoderme en épiderme.* — Nous avons vu au chapitre II qu'à 5 jours d'incubation le mésenchyme dermique est encore recouvert d'une seule assise de cellules ectodermiques. Entre 5 et 6 jours d'incubation, cet ectoderme se différencie progressivement en épiderme typique à deux assises cellulaires. A partir de 6 jours d'incubation, l'épiderme possède, par conséquent, une polarité « interno-externe » nettement établie : une couche profonde, l'épiderme proprement dit, formée de cellules hautes et une couche superficielle, le périoderme, composée de cellules aplaties (fig. 30, Pl. I).

Le derme joue-t-il un rôle déterminant dans la formation de l'épiderme et l'établissement de sa polarité ?

Trois séries expérimentales répondent à cette question.

Première série expérimentale. — Association de derme de stade 1 (D_1) et d'ectoderme unistratifié inversé de 5 jours d'incubation (iEc) : iEc/D_1 (fig. 15).

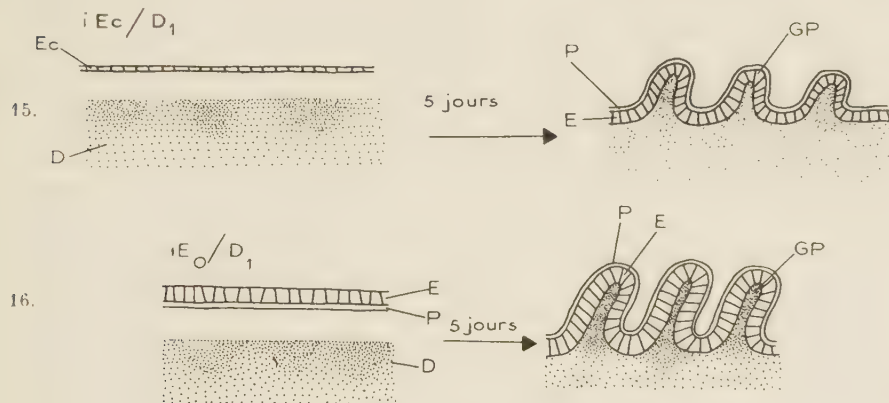


FIG. 15. — Évolution *in vitro* de l'association d'ectoderme inversé de 5 jours d'incubation (iEc) et de derme de stade 1 (D_1) : iEc/D_1 .

FIG. 16. — Évolution *in vitro* de l'association d'épiderme inversé de stade 0 (iE_0) et de derme de stade 1 (D_1) : iE_0/D_1 .

D , derme avec 3 ébauches plumaires ; E , assise basale de l'épiderme ; Ec , ectoderme unistratifié ; GP , germe plumaire ; P , périoderme.

L'ectoderme est déposé sur la surface externe du derme avec sa face externe contre le derme. En raison de la grande fragilité de l'ectoderme unistratifié, ces associations sont très difficiles à cultiver. Dans certains cas, l'ectoderme s'étrécit considérablement et très rapidement. Il forme finalement un petit amas de cellules qui n'adhère plus au derme. Dans ces conditions, aucune différenciation ne peut se réaliser.

Sur 6 associations de ce type, seules 2 se sont maintenues pendant 5 jours de culture et ont ainsi pu se différencier. Elles ont donné naissance l'une à 4, l'autre à 5 germes plumaires de 0,12 mm. L'histologie de ces 2 associations révèle qu'il s'est constitué, à partir de l'ectoderme inversé,

un épiderme tout à fait normal, composé des deux assises cellulaires typiques (fig. 66 et 67, Pl. II). Malgré la faible proportion de réussites, ces expériences indiquent déjà le rôle du derme dans la différenciation histologique de l'ectoderme et dans l'établissement de la polarité interno-externe de l'épiderme. Le rôle du derme est démontré d'une manière plus probante dans la série expérimentale suivante.

Deuxième série expérimentale. — Pour préciser la nature et la durée de cette activité dermique, nous avons explanté des associations, plus faciles à réaliser et à cultiver, d'épiderme inversé de stade 0 (iE_0) et de derme de stade 1 (D_1). L'épiderme est déposé sur le derme avec sa face péri-dermique contre la face externe du derme : iE_0/D_1 (fig. 16).

Sur 12 associations iE_0/D_1 , 11 se sont développées *in vitro* comme les associations témoins E_0/D_1 dont l'épiderme n'a pas été inversé. Au bout de 5 jours de culture, elles se sont couvertes de germes plumaires bien formés et d'aspect normal. A l'examen histologique, les explants présentent une structure tout à fait semblable à celle des témoins. Leur épiderme est composé des deux couches typiques qui ont repris une disposition harmonieuse par rapport au derme : la couche profonde avec ses cellules hautes et cuboïdes est en contact avec le derme ; les cellules aplaties de la couche superficielle limitent extérieurement la peau qui retrouve ainsi un aspect tout à fait normal (fig. 68, Pl. II).

Un tel épiderme remanié ne se distingue guère d'un épiderme normal que par son péri-derme un peu plus épais et par la forme sphérique de ses noyaux péri-dermiques (fig. 68, Pl. II). Le péri-derme normal est relativement mince, ses noyaux étant allongés en fuseau parallèlement à la surface de la peau (fig. 69, Pl. II).

Le derme de stade 1 est donc non seulement capable d'induire la différenciation de l'ectoderme en épiderme, mais encore d'imposer à l'épiderme inversé de 6 jours un remaniement de ses couches cellulaires, tel que l'association présente, en fin de culture, la structure d'une peau normale.

Troisième série expérimentale. — Associations d'épiderme inversé de stade 1 (iE_1) et de derme de stade 1 (D_1) : iE_1/D_1 (fig. 17).

A quel stade la polarité de l'épiderme est-elle fixée d'une manière irréversible ?

Les 8 associations iE_1/D_1 ne se sont pas développées normalement. Après 5 jours de culture, aucune d'entre elles ne s'est couverte de germes plumaires. L'épiderme greffé n'est plus visible. L'aspect extérieur de l'explant semble indiquer que les fragments ne sont pas en excellent état. A l'examen histologique, l'explant présente une structure tout à fait inhabituelle.

L'épiderme s'est différencié en poussant, dans la profondeur de la masse dermique, des digitations qui ont la forme d'un germe plumaire (fig. 65, 70 et 71, Pl. II). Ces digitations sont bordées par le péri-derme sur leur face convexe ; l'épiderme proprement dit constitue leur face concave.

Certaines d'entre elles font saillie à la face inférieure de l'explant et viennent buter contre la surface du milieu de culture (fig. 65, Pl. II). Une grande partie du derme est en voie de dégénérescence. Seules les cellules dermiques logées à l'intérieur des digitations sont en bon état et se multiplient activement. L'épiderme également montre de nombreuses figures de mitoses.

L'épiderme de stade 1 possède donc une polarité interno-externe qui est définitivement fixée et ne peut plus être influencée par l'induction dermique. De plus, il est capable de poursuivre sa morphogénèse selon

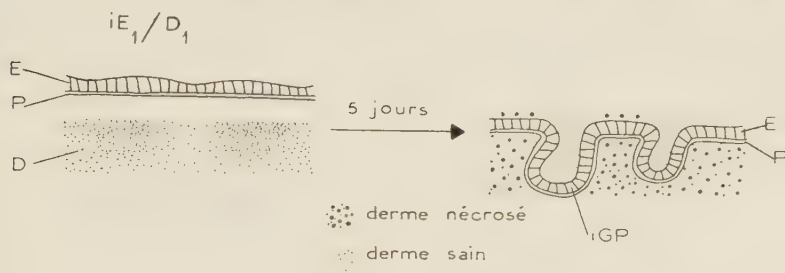


FIG. 17. — Évolution *in vitro* de l'association d'épiderme inversé de stade 1 (iE_1) et de derme de stade 1 (D_1) : iE_1/D_1 .

D , derme avec 2 ébauches plumaires ; E , assise basale de l'épiderme ; iGP , germe plumaire inversé s'enfonçant dans le derme ; P , périderme.

sa polarité normale. Il en résulte des germes plumaires inversés qui s'enfoncent dans le mésenchyme dermique.

Quelle part le derme prend-il dans l'édification de ces germes inversés ? Il est difficile de le savoir. Toujours est-il que certaines cellules dermiques réussissent à venir occuper une position harmonieuse par rapport à l'épiderme : elles gagnent l'intérieur de la gaine épidermique où elles participent vraisemblablement à la différenciation du germe. Quelle voie les cellules dermiques empruntent-elles pour passer de la face péridermique à la face profonde de l'épiderme ? On trouve, par endroits, des brèches dans la palissade épidermique, au niveau desquelles les cellules dermiques semblent s'infiltrer. Ces interstices sont une voie de pénétration possible (fig. 71, Pl. II).

Les cellules dermiques qui restent du côté péridermique de l'épiderme ne participent pas à la différenciation du germe inversé et sont voués à la nécrose (fig. 65, 70 et 71, Pl. II).

Cette dernière série expérimentale montre, d'une part, que la polarité interno-externe de l'épiderme est établie d'une manière irréversible à partir du stade 1 et, d'autre part, que, dès ce stade, l'épiderme joue un rôle actif dans la morphogénèse du germe plumaire et se différencie selon sa polarité propre.

4. Rôle de l'épiderme dans la détermination de l'orientation des germes plumaires. — Les germes plumaires de l'embryon de poulet ont

tous une orientation bien définie. Ceux de la région du dos sont tous inclinés vers l'arrière, leur extrémité distale se dirigeant vers la queue de l'embryon. Cette orientation est-elle déterminée par le derme ou par l'épiderme ?

Nous avons explanté des associations de derme de stade 1 et d'épiderme des stades 0 et 1, dans lesquelles l'épiderme est déposé sur le derme après rotation de 180° ou de 90° de son axe céphalo-caudal par rapport à l'orientation du derme. Des associations témoins sont cultivées dans lesquelles l'épiderme a conservé son orientation normale.

Première série expérimentale. — Rotation de 180° : $180^\circ E_{0-1}/D_1$ (fig. 18).

Sept associations $180^\circ E_0/D_1$ et 8 associations $180^\circ E_1/D_1$ ont été cultivées pendant 5 jours. En fin de culture, les explants des deux types présentent

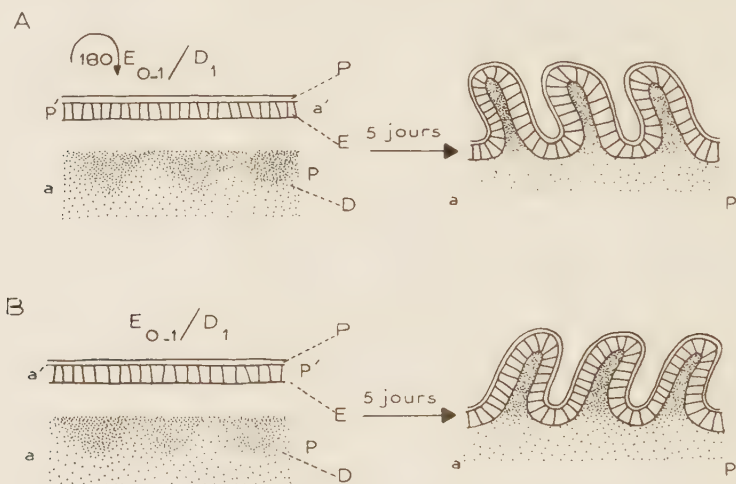


FIG. 18. — A, évolution *in vitro* de l'association de derme de stade 1 (D_1) et d'épiderme de stade 0 ou 1, après rotation de l'axe céphalo-caudal de l'épiderme de 180° par rapport à celui du derme ($180^\circ E_{0-1}$) : $180^\circ E_{0-1}/D_1$.

B, Évolution *in vitro* de l'association témoin dont l'épiderme n'a pas été tourné : E_{0-1}/D_1 .

D, derme ; E, assise basale de l'épiderme ; P, périderme ; a-p, axe céphalo-caudal du fragment de derme ; a'-p', axe céphalo-caudal du fragment d'épiderme.

tous en moyenne 12 germes plumaires dont l'orientation générale est, dans les 15 cas, conforme à l'orientation de l'épiderme. Les germes ont leur extrémité libre dirigée vers le bord caudal de l'épiderme et, par conséquent, vers le bord céphalique du derme (fig. 72, Pl. III). Il arrive qu'un petit nombre de germes soit orienté n'importe comment. On ne peut en déduire une éventuelle influence perturbatrice du derme, car de telles orientations discordantes s'observent également dans les cultures témoins (fig. 73, Pl. III).

Deuxième série expérimentale. — Rotation de 90° : $90^\circ E_0/D_1$.

Les associations sont réalisées de la même manière que dans la série précédente, mais l'épiderme est déposé sur le derme de manière que son

bord céphalique coïncide avec le bord médiodorsal du fragment de derme.

Les 6 associations de ce type confirment les résultats de la première série expérimentale. L'orientation des germes est toujours conforme à celle de l'épiderme, l'extrémité libre des germes est dirigée vers le bord postérieur du fragment d'épiderme et, par conséquent, vers le bord latéral du fragment de derme (fig. 77, Pl. III).

L'épiderme de stade 0 ou 1 n'a pas encore de rôle dans l'excroissance du germe plumaire (voir chap. III, § B, p. 462). Il est pourtant seul responsable de l'orientation des germes plumaires. Il est intéressant de voir que l'épiderme précoce de stade 0 possède déjà une orientation céphalo-caudale intrinsèque et indécélable histologiquement. Il est capable d'imposer cette orientation aux germes plumaires dont la première différenciation, dans ces associations, est le seul fait de l'induction dermique. Cette influence orientatrice de l'épiderme est de longue durée ; elle est déjà présente à 5 jours 3/4 d'incubation et persiste jusqu'à 7 jours au moins.

C. — Action du derme et de l'épiderme de la région dorsale sur des tissus non plumigènes.

Les expériences des paragraphes précédents démontrent les rôles respectifs des deux constituants de la peau dans la différenciation et la croissance des germes plumaires : induction dermique, d'une part, et épidermique, d'autre part.

L'induction dermique peut-elle également s'exercer sur un épiderme ne formant normalement pas de germes plumaires ? Inversement, existe-t-il d'autres mésenchymes capables de répondre à l'induction épidermique ?

1. Associations de derme de la région dorsale et d'épiderme non plumigène. — Les fragments de derme de stade 1 sont obtenus, comme d'habitude, à partir de la peau dorsale de l'embryon de poulet. Les fragments d'épiderme proviennent d'embryons de poulet de 11 à 13 jours d'incubation et sont prélevés, dans la première série expérimentale, dans la région de la crête, dans la deuxième série, dans la région tarso-métatarsienne.

Première série expérimentale. — Association d'épiderme de la crête (E crête 12 j.) et de derme dorsal de stade 1 (D_1) : E crête 12 j./ D_1 (fig. 19).

Des fragments de peau d'environ $2 \times 1,5$ mm sont découpés sur les faces latérales de la crête, puis soumis à l'action de la trypsine, selon la méthode habituelle.

L'épiderme de la crête de 12 jours d'incubation est un épiderme banal à deux assises cellulaires, assez mince et non encore différencié (fig. 74, Pl. III).

Cinq associations d'épiderme de la crête et de derme dorsal de stade 1 ont été cultivées sur le milieu standard pendant 5 jours. Elles se sont toutes différenciées en donnant des germes plumaires d'aspect extérieur tout à fait normal (fig. 76, Pl. III). Leur nombre est de 8 en moyenne, leur taille moyenne de 0,25 mm.

L'examen histologique de ces associations montre que les germes plumaires sont recouverts d'un épiderme très épais. L'épiderme proprement dit est différencié en deux zones bien distinctes : l'assise basale génératrice d'une part, et 5 à 6 assises de cellules aplaties en voie de kératinisation d'autre part. Le périoderme comporte 2 assises de cellules chargées de granulations de kératohyaline (fig. 79, Pl. III).

Cette kératinisation précoce est certainement due au caractère « crête » de l'épiderme et à son stade avancé (12 jours) au moment de l'explan-

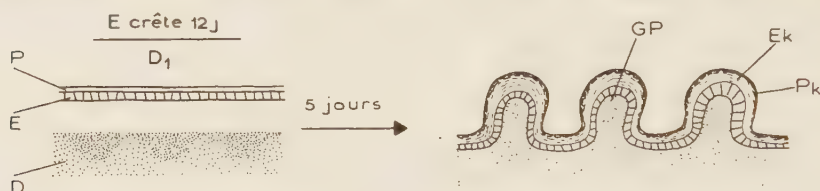


FIG. 19. — Évolution *in vitro* de l'association d'épiderme de la face latérale de la crête de 12 jours (E crête 12 jours) et de derme dorsal de stade 1 (D_1) : E crête 12 jours/ D_1 .

D_1 , derme ; E, assise basale de l'épiderme ; Ek, épiderme en voie de kératinisation ; GP, germe plumeux ; P, péri-derme ; Pk, péri-derme chargé de grains de kératohyaline.

tation. En effet, la peau dorsale prélevée entre 7 et 8 jours d'incubation ne se kératinise *in vitro* qu'après une culture prolongée au-delà de 10 jours (cf. chap. II, p. 442).

L'épiderme de la crête, qui, normalement, ne donne pas de germes plumaires, est donc capable de répondre à l'induction dermique par une différenciation morphologique identique à celle d'un fragment d'épiderme plumigène.

Deuxième série expérimentale. — Association d'épiderme de la région tarso-métatarsienne (E tmt 12 j.) et de derme dorsal de stade 1 (D_1) : E tmt 12 j./ D_1 (fig. 20).

Nous nous sommes adressés à des fragments d'épiderme prélevés sur la face antérieure de la région tarso-métatarsienne d'embryons de 12 jours d'incubation. Normalement, cet épiderme est destiné à former des écailles ou scutelles. Au moment du prélèvement, les concours des futures écailles sont déjà très nettement indiqués (fig. 82, Pl. III). L'aspect histologique de l'épiderme de la région tarso-métatarsienne de 12 jours diffère de celui de l'épiderme de la région dorsale de 6 jours par son épiderme comportant déjà 4 à 5 assises cellulaires (fig. 83, Pl. III) (cf. E.-A. BARTELS, 1943). La taille des fragments d'épiderme est d'environ 4×2 mm. Ils sont associés avec des fragments de derme de même taille.

Six associations (E tmt 12 j./D₁) ont développé, au bout de 5 jours de culture sur le milieu standard, de nombreux germes de dimensions et de structure normales (en moyenne 25 germes plumaires de 0,30 mm) (fig. 81, Pl. III). Les fragments de peau témoins, prélevés dans la région tarso-métatarsienne, se différencient *in vitro* selon leur destinée normale. Les écailles s'allongent, s'épaississent et se recouvrent graduellement les unes les autres (fig. 88, Pl. III). Leur aspect, aplati et échancré au bord postérieur, ne peut être confondu avec celui des germes plumaires cylindriques et dressés.

Comme l'épiderme de la crête, l'épiderme non plumigène de la région tarso-métatarsienne se différencie morphologiquement sous l'influence du derme dorsal. Comme le montre la figure 87, Pl. III, sa différenciation histologique est très précoce : on observe un début de kératinisation

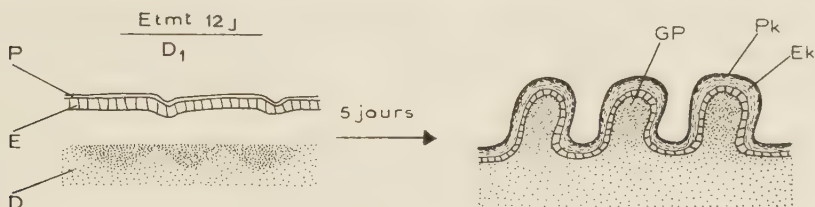


FIG. 20. — Évolution *in vitro* de l'association d'épiderme tarso-métatarsien de 12 jours (E tmt 12 jours) et de derme dorsal de stade 1 (D₁) : E tmt 12 jours/D₁.

D, derme ; E, assise basale de l'épiderme ; Ek, épiderme en voie de kératinisation ; GP, germe plumaire ; Pk, périderme chargé de grains de kératohyaline.

caractérisé par l'épaississement de l'épiderme et l'accumulation de grains de kératohyaline (1) dans les cellules péridermiques. Cet aspect est tout à fait comparable à celui de l'épiderme des fragments de peau témoins prélevés dans la région tarso-métatarsienne et cultivés pendant 5 jours (fig. 84, Pl. III).

Ces expériences montrent que l'épiderme de 12 jours de la région tarso-métatarsienne est encore capable, malgré une différenciation histologique de type tarso-métatarsien, de réagir au caractère régional de l'induction dermique par la formation de germes plumaires, alors que sa différenciation en écailles était déjà amorcée.

Les résultats de ces deux séries d'explantation rejoignent ceux de J. M. CAIRNS et J. W. SAUNDERS, Jr. (1954) et de J. W. SAUNDERS, Jr., M. T. GASSELING et J. M. CAIRNS (1955), qui montrent que l'élément mésodermique de la peau est responsable du caractère régional des différenciations cutanées. Nos expériences établissent que cette différenciation régionale peut encore être modifiée très tardivement par les conditions expérimentales.

(1) On observe, dans le périderme de la peau en voie de kératinisation, tantôt des granulations basophiles de kératohyaline typique, tantôt des granulations fortement éosinophiles dont nous n'avons encore pu déterminer la nature exacte.

2. Associations de derme non plumigène et d'épiderme de la région dorsale. — Nous avons explanté sur le milieu standard les associations inverses de celles décrites au paragraphe précédent. Les fragments d'épiderme, de stades 1 et 2, sont prélevés sur la peau dorsale de l'embryon de poulet. Le derme provient de la région de la crête et de la région tarso-métatarsienne antérieure d'embryons de 12 jours d'incubation.

Première série expérimentale. — Les 5 associations de derme de la crête et d'épiderme dorsal de stade 2 ne se sont pas différenciées. Les 5 associations témoins d'épiderme de stade 2 et de derme dorsal de même stade se sont développées normalement. Le derme de la crête n'est donc pas capable de réagir à l'induction épidermique, soit en raison de son âge avancé, soit en raison de son caractère régional.

Deuxième série expérimentale. — Les 6 associations de derme tarso-métatarsien et d'épiderme dorsal de stade 2 se sont différenciées comme suit, après 5 jours de culture.

TABLEAU VII. — DIFFÉRENCIATION, APRÈS 5 JOURS DE CULTURE, DES ASSOCIATIONS DE DERME TARSO-MÉTATARSIEEN DE 12 JOURS ET D'ÉPIDERME DORSAL DE STADE 2.

ASSOCIATION.	NOMBRE DE GERMES PLUMAIRES.	NOMBRE D'ÉCAILLES.	AUTRES FORMATIONS.
N° 1	6	8	—
N° 2	4	10	—
N° 3	—	5	Environ 8 très grosses écailles peu distinctes les unes des autres, peu aplaties, mais échancrées.
N° 4	—	6	—
N° 5	5	7	—
N° 6	—	4	—

On remarquera que les 6 associations ont formé des écailles et réalisé ainsi une différenciation conforme à la nature du derme. Trois associations présentent, à côté des écailles, des germes plumaires typiques, qui sont vraisemblablement le résultat de l'activité propre de l'épiderme de stade 2 (fig. 86, Pl. III).

Devant l'ambiguïté de ces résultats, j'ai cultivé d'autres associations de derme tarso-métatarsien et d'épiderme dorsal. Pour obtenir une réponse décisive, l'épiderme est prélevé sur des embryons de 6 jours 1/4 d'incubation, au moment de l'apparition de la crête médiodorsale et avant celle de la première rangée d'ébauches (stade 1 très jeune). Le derme est prélevé sur la face antérieure de la région tarso-métatarsienne d'embryons de 11 et 13 jours d'incubation. Dans la peau de la région tarso-métatarsienne de 11 jours, les écailles sont à peine ébauchées ; dans celle de 13 jours, elles sont bien formées et commencent à saillir. On réalise les

associations E_1/D tmt 11 j. et E_1/D tmt 13 j. (fig. 21 et 22). Les résultats de ces explantations figurent dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII. — DIFFÉRENCIATION APRÈS 5 JOURS DE CULTURE
DES ASSOCIATIONS DE DERME TARSO-MÉTATARSIEEN DE 11 ET 13 JOURS
ET D'ÉPIDERME DORSAL DE STADE 1 (6 JOURS 1/4).

ASSOCIATIONS.	NOMBRE DE GERMES PLUMAIRES.	NOMBRE D'ÉCAILLES.	OBSERVATIONS.
E_1 <u>D tmt 11 jours.</u>	24	0	Écailles peu saillantes et peu développées.
	9	0	
	5	0	
	13	0	
	0	4	
E_1 <u>D tmt 13 jours.</u>	0	6	Très belles écailles se re- couvrant les unes les autres.
	0	8	
	0	8	
	0	10	
	0	6	
	0	8	
	0	10	

Dans le cas du derme de 11 jours, 4 associations sur 5 ont développé des germes plumaires typiques. Une association est couverte de 4 écailles à peine ébauchées et mal formées. Au contraire, avec le derme de 13 jours, toutes les associations ont fourni des écailles bien nettes, très larges, et se recouvrant les unes les autres (fig. 85, Pl. III). Les résultats de cette série expérimentale permettent de comprendre ceux de la série précédente. A 11 jours, l'activité inductrice du derme de la région tarso-métatarsienne est encore insuffisante pour transformer la destinée normale de l'épiderme dorsal. Au cours du treizième jour, son activité augmente progressivement ; il semble qu'il y ait un conflit entre le derme et l'épiderme qui aboutit aux formations hybrides comportant à la fois des écailles et des germes plumaires. Enfin, à 13 jours, le derme est capable d'imposer à l'épiderme la qualité de sa différenciation. On n'observe plus de germes plumaires ; tous les explants différencient des écailles.

L'histologie montre que ces écailles sont recouvertes d'un épiderme très épais. Au-dessus de l'assise basale, on trouve 3 à 4 assises de cellules polyédriques, puis 1 à 2 assises de cellules aplaties en voie de kératinisation. Le périoderme, très développé, est composé de 2 à 3 assises qui se détachent par endroits de l'épiderme proprement dit ; ses cellules sont chargées de granulations fortement éosinophiles (1) (fig. 89 et 91, Pl. III).

(1) Voir note infrapaginale p. 473.

Le derme de la région tarso-métatarsienne est donc capable d'accélérer la différenciation histologique de l'épiderme dorsal et de lui conférer l'aspect caractéristique de l'épiderme d'écaille (fig. 90, Pl. III).

Il est curieux de voir que la détermination qualitative d'un fragment d'épiderme dorsal de stade 1 très jeune est déjà établie. Elle s'exprime par la formation de germes plumaires lorsque l'épiderme est en contact avec le derme tarso-métatarsien inactif de 11 jours. Elle est déviée de sa voie normale, lorsque l'épiderme, subissant l'induction du derme tarso-métatarsien de 13 jours, développe des écailles.

Il faut penser que l'agent qui détermine la qualité de la différenciation épidermique, s'il réside initialement dans le derme, comme le montrent

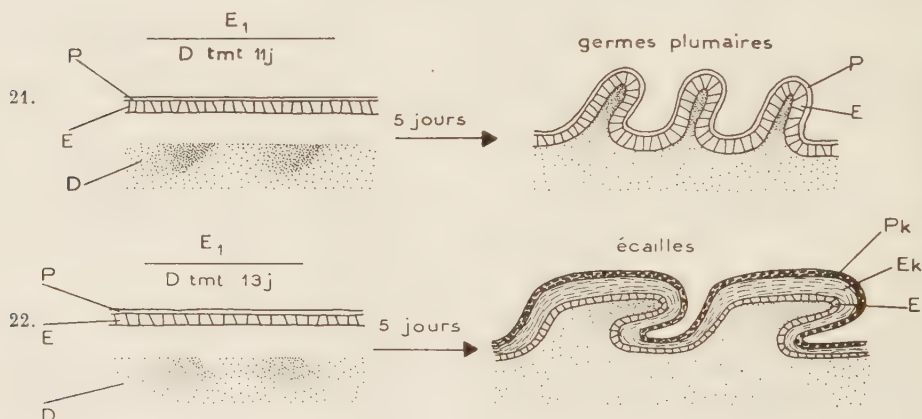


FIG. 21. — Évolution *in vitro* de l'association d'épiderme dorsal de stade 1 (E_1) et de derme tarso-métatarsien de 11 jours (D tmt 11 jours) : E_1 /D tmt 11 jours.

FIG. 22. — Évolution *in vitro* de l'association d'épiderme dorsal de stade 1 (E_1) et de derme tarso-métatarsien de 13 jours (D tmt 13 jours) : E_1 /D tmt 13 jours.

D, derme ; E, assise basale de l'épiderme ; Ek, épiderme en voie de kératinisation ; P, périderme ; Pk, périderme chargé de granulations fortement éosinophiles.

les expériences des paragraphes précédents, passe très rapidement dans l'épiderme où il continue à exercer son action morphogène.

Il y a un parallélisme étroit entre le déterminisme de l'excroissance du germe plumaire, et celui de la qualité de la différenciation épidermique. Dans les deux processus, le derme fournit à l'épiderme une première impulsion qui déclenche la différenciation. Très rapidement, l'épiderme acquiert à son tour les propriétés inductrices qui lui ont été transmises par le derme.

3. Associations d'épiderme plumigène de la région dorsale et de différents mésenchymes non dermiques. — Nous avons réalisé des asso-

ciations d'épiderme dorsal de stade 2 et de mésenchymes pulmonaire. mésonéphrétique et sous-cutané dorsal de 7 jours d'incubation et les avons cultivées sur le milieu standard.

Les mésenchymes pulmonaire et mésonéphrétique (8 et 7 cas, respectivement) sont incapables de répondre à l'induction épidermique. L'épiderme greffé reste plat, bien que, en certains endroits, il présente de très petites papilles constituées uniquement de cellules épidermiques accolées. Il s'agit vraisemblablement d'une velléité d'excroissance de l'épiderme qui avorte faute de réactivité du mésenchyme (fig. 78 et 80, Pl. III).

Les associations d'épiderme et de mésenchyme sous-cutané ont donné naissance, dans 5 cas sur 7, à des germes plumaires bien constitués (6 en moyenne), d'environ 0,25 mm (fig. 75, Pl. III).

Par conséquent, parmi les mésenchymes éprouvés, seul le mésenchyme sous-cutané semble avoir des propriétés assez voisines de celles du derme pour réagir à l'influence épidermique.

Conclusions.

Les expériences de ce chapitre étudient les facteurs qui président à la différenciation de la peau et des germes plumaires. Elles ont permis de mettre en évidence les rôles respectifs du derme et de l'épiderme.

Le développement de la peau et des germes plumaires ne se poursuit *in vitro*, sur le milieu standard à base d'extrait embryonnaire, que si le derme a amorcé sa différenciation au moment de l'explantation. Si l'explantation a lieu avant l'apparition des ébauches plumaires dermiques, la peau ne franchit pas le seuil de sa différenciation.

On peut obtenir la différenciation des ébauches à partir de la peau indifférenciée, si on explante cette dernière sur un milieu contenant du plasma de poulet ou sur un fragment d'organe embryonnaire vivant ou tué à la chaleur. Les organes associés et le plasma de poulet ont, par conséquent, des propriétés morphogènes qui font défaut au jus d'embryon. Ces organes et le plasma de poulet contiennent vraisemblablement une ou plusieurs substances, capables de déclencher dans la peau indifférenciée la formation des ébauches plumaires. Il s'agit apparemment de substances non spécifiques, sous l'effet desquelles la peau serait à même de poursuivre sa destinée normale.

L'activité du derme, au cours de la différenciation de la peau et des germes plumaires, est triple : 1° Il provoque la transformation de l'ectoderme à une seule assise en épiderme à deux assises de cellules ; il détermine également la polarité interno-externe de l'épiderme. Cette dernière ne se fixe définitivement qu'au cours du septième jour d'incubation. 2° Dès la formation des ébauches plumaires dermiques, le derme exerce sur l'épiderme une impulsion inductrice de courte durée ; elle s'étend de 6 jours $\frac{3}{4}$ à 7 jours $\frac{1}{4}$ et entraîne l'épaississement et le début de l'excroissance de l'épiderme situé au-dessus des concentrations dermiques. 3° Enfin, le

derme détermine le caractère régional des différenciations épidermiques : selon son origine dorsale ou tarso-métatarsienne, le derme induit dans l'épiderme la différenciation de germes plumaires ou d'écailles. Il est admis depuis longtemps, et particulièrement depuis les travaux de H. R. DAVIES (1889), de P. BLASZYK (1935) et de A. GERBER (1939), que l'écaille et la plume (ou, plus exactement, le « complexe plumeux », selon A. GERBER, 1939) des Oiseaux sont des différenciations épidermiques homologues. Cette opinion implique l'existence chez l'embryon d'Oiseau d'une bipotentialité de la peau, qui est ainsi confirmée par l'expérience.

L'épiderme joue deux rôles différents, l'un orienteur des germes plumaires, l'autre inducteur de la différenciation et de la croissance du germe. Dès 6 jours d'incubation, l'épiderme recèle une orientation céphalo-caudale intrinsèque qui détermine l'orientation future des germes plumaires. Ceux-ci s'allongent en s'inclinant vers le pôle caudal de l'épiderme. Au début du huitième jour, la seconde activité de l'épiderme entre en jeu. L'épiderme induit les cellules dermiques à constituer l'axe du germe plumeux et à garnir la gaine épidermique qui s'allonge. Il est capable d'exercer cette action inductrice non seulement sur la face supérieure du derme, mais également sur sa face profonde et sur le mésenchyme sous-cutané. Face profonde du derme et mésenchyme sous-cutané sont, parmi les mésenchymes éprouvés, les seuls qui répondent à l'induction épidermique par la formation de germes plumaires.

Il est intéressant de rapprocher nos résultats des investigations histo-chimiques de H. L. HAMILTON et collaborateurs (A. L. KONING et H. L. HAMILTON, 1954 ; H. L. HAMILTON et A. L. KONING, 1956 ; H. L. HAMILTON, R. L. SINSHEIMER et G. W. HINSCH, 1956 ; A. L. KONING, 1957). Ces auteurs montrent que la papille dermique de l'ébauche et du germe plumeux en voie de différenciation est chargée de phosphatase alcaline. En regard de cette activité phosphatasique, l'épiderme élabore, à la base de ses cellules, de l'acide ribonucléique. L'intervention d'un inhibiteur de la phosphatase, tel que le beryllium, ou de l'acide ribonucléique étranger, provoque l'arrêt de la différenciation des germes plumaires et entraîne, dans l'épiderme, une baisse considérable de la teneur en acide ribonucléique. HAMILTON et ses collaborateurs pensent que la phosphatase alcaline du derme joue un rôle déterminant dans la synthèse de l'acide ribonucléique de l'épiderme.

Les propriétés inductrices de l'ébauche dermique que démontrent nos expériences sont vraisemblablement liées à son activité phosphatasique, puisque l'inhibition de cette activité empêche toute différenciation. Par ailleurs, on peut mettre en parallèle le pouvoir inducteur de l'épiderme et l'accumulation d'acide ribonucléique dans ses cellules, les deux phénomènes étant tributaires de l'activité morphogénétique et histo-chimique de la papille dermique.

Tous ces résultats nous autorisent à donner une description précise des processus morphogénétiques qui aboutissent à l'édification des germes plumaires. On distingue quatre phases.

Première phase. — Entre 5 et 6 jours d'incubation, sous l'influence du mésenchyme dermique, l'ectoderme indifférencié se transforme en épiderme typique à deux assises cellulaires. Dès lors, la peau est constituée, et son épiderme possède déjà l'orientation céphalo-caudale qu'il imposera aux futurs germes plumaires (fig. 23, 1^{re} phase).

Deuxième phase. — Aux environs de 6 jours 1/4, les cellules du derme se concentrent en petits amas qui sont la partie mésodermique des ébauches plumaires. L'inducteur normal de cette transformation du derme n'a pas encore été localisé. Il n'a pas son siège dans la peau, mais peut être fourni par des fragments d'organes embryonnaires ou par le plasma de

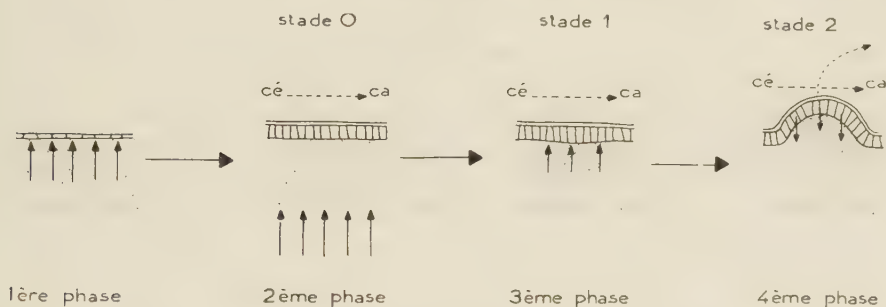


FIG. 23. — Schéma des quatre inductions successives (matérialisées par les petites flèches parallèles) qui aboutissent à la formation du germe plumaire. Les flèches rectilignes, en trait interrompu, indiquent l'orientation céphalo-caudale (cé — ca) de l'épiderme qui détermine l'orientation du germe plumaire (flèche curviligne).

poulet. Ces faits permettent de penser que certaines substances, élaborées dans l'ensemble des tissus situés sous la peau, sont transmises au derme aux environs de 6 jours d'incubation. Le derme répondrait à cette stimulation externe par la formation des ébauches plumaires (fig. 23, 2^e phase).

Troisième phase. — Dès qu'elle a subi la stimulation dont il vient d'être question, la peau se suffit à elle-même. Les expériences du chapitre II ont montré, en effet, que la peau continue sa différenciation *in vitro*, même explantée sur le milieu T, constitué uniquement d'une solution physiologique glucosée. Au milieu du septième jour d'incubation, l'élément mésodermique de la peau, le seul différencié à ce stade, entre en activité. Chaque ébauche plumaire dermique est un centre d'induction qui agit sur l'épiderme sus-jacent. Ce dernier s'épaissit au-dessus de chaque ébauche dermique et commence à s'exhausser. En même temps, le derme transmet à l'épiderme son caractère régional. C'est lui qui décide, selon son origine propre, de la qualité de la différenciation épidermique (fig. 23, 3^e phase).

Dès que les deux éléments du futur germe plumaire — axe dermique et gaine épidermique — sont en place, le derme cesse son activité proprement morphogène. Son action sur la différenciation régionale de l'épi-

derme n'est pas pour autant terminée et se poursuit apparemment jusqu'au treizième jour d'incubation au moins.

Quatrième phase. — Au début du huitième jour, l'épiderme ajoute à son activité orientatrice des germes un rôle inducteur morphogène. Il relaie en quelque sorte le derme et dirige dès lors l'excroissance du germe. Sous son influence, le derme continue sa différenciation et constitue l'axe mésodermique du germe plumaire (fig. 23, 4^e phase).

Il est remarquable que le rôle de fixer l'orientation du germe plumaire est dévolu à l'épiderme, et à l'ébauche dermique celui de déterminer la qualité de la différenciation épidermique. Selon les résultats de H. WANG (1943, 1944), ces rôles sont inversés lors de la régénération de la plume adulte : c'est la papille dermique qui est responsable de l'orientation de la plume dans son follicule ; mais le type morphologique de sa différenciation dépend de l'épiderme. Il est vrai qu'il s'agit, dans les expériences de H. WANG, de la détermination de la qualité régionale d'un même organe, la plume, alors que, dans nos expériences, il s'agit de la différenciation de deux organes cutanés différents, le germe plumaire et l'écaille.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DE LA PIGMENTATION DE LA PEAU CULTIVÉE SUR DES MILIEUX NATURELS ET SYNTHÉTIQUES

APERÇU HISTORIQUE.

P. C. KOLLER (1929) et O. LUBARSCH (1931) sont sans doute parmi les premiers à avoir étudié la production du pigment en culture de tissus. Il revient à F. DORRIS (1936 à 1942), à H. L. EASTLICK (1939, *b*) et à H. RIS (1941) d'avoir démontré, par la culture de fragments méséctodermiques de l'embryon de poulet et par des expériences de greffes, que les mélanoblastes (1) des Oiseaux prennent naissance dans la crête neurale. La migration des mélanoblastes vers la peau a été décrite par B. H. WILLIER et M. E. RAWLES (1938, 1942), M. J. FOX (1949) et J. W. SAUNDERS, Jr. (1949). V. HAMILTON (1940) montre que la migration cesse pratiquement dès la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes. M. E. RAWLES (1940 à 1948) a analysé le déterminisme de la migration des mélanoblastes ; elle déduit de ses observations que les mélanoblastes des races noires migrent plus facilement que ceux de la race Leghorn blanche ; de plus, elle a émis l'hypothèse selon laquelle de nouveaux mélanoblastes ne peuvent envahir une région déjà colonisée. Cette hypothèse a pu être vérifiée par les travaux de V. C. TWITTY et M. C. NIU (1954) qui ont démontré que les mélanoblastes se repoussent l'un l'autre lorsqu'ils sont confinés dans un petit espace.

L'étude des processus de la pigmentation de la peau, des germes plumaires et des plumes par les mélanocytes ont donné lieu à de nombreuses publications dans le détail desquelles il n'est pas nécessaire d'entrer ici (C. H. DANFORTH, 1929, 1937, 1939 ; W. GREITE, 1934 ; L. E. DELANNEY, 1941 ; B. H. WILLIER, 1941, 1942, 1952, 1953 ; R. L. WATTERSON, 1942 ; H. WANG, 1944 ; R. F. WHITE et H. L. EASTLICK, 1953 ; O. KUHN et H. U. KÖCKE, 1956).

Les recherches biochimiques étudient les mécanismes chimiques de la synthèse de la mélanine. Elles mettent en évidence, parmi les nombreux agents influant sur la pigmentation, trois facteurs principaux qui sont : la tyrosine ou la DOPA (2), la tyrosinase et l'oxygène (B. BLOCH, 1917.

(1) Voir note infrapaginale, p. 437.

(2) 3,4 — dihydroxyphénylalanine.

a et *b* ; B. BLOCH et F. SCHAAF, 1925 ; H. S. RAPER et C. E. M. PUGH, 1927 ; H. S. RAPER, 1932 ; A. B. LERNER et T. B. FITZPATRICK, 1950, 1953 ; D. KERTESZ, 1953 ; A. S. BAKER, 1953 ; H. S. MASON, 1953, 1956 ; E. F. TRAUB et H. J. SPOOR, 1953 ; R. GONNARD et C. ALLUCHON, 1954 ; A. B. LERNER, 1955).

F. E. MORBECK et J. W. SAUNDERS, JR. (1950, 1951), J. W. SAUNDERS, JR., W. C. QUEVEDO, L. PIERRO et F. E. MORBECK (1955) ont éprouvé l'action de la tyrosine et de la phénylalanine sur des fragments de peau de race noire cultivée *in vitro*. Ils ont constaté un accroissement de la pigmentation sous l'influence de la tyrosine, une diminution de la pigmentation, au contraire, avec la phénylalanine.

Signalons enfin les travaux de microscopie en contraste de phase et électronique qui ont permis à N. WEISSENFELS (1956) de localiser, au sein du cytoplasme des mélanoblastes, les territoires où apparaît le propigment. Selon cet auteur, ces territoires ne se superposent ni à la zone de Golgi ni au chondriome.

A. — Race pigmentée.

Chez les embryons de poulet de la race Noire d'Alsace, la pigmentation apparaît dans la peau dorsale au cours du huitième jour d'incubation. On sait (M. J. Fox, 1949) que les mélanoblastes ont colonisé la peau de la région dorsale dès le stade de 30 à 40 somites. L'excroissance des germes plumaires et la différenciation des mélanocytes ne sont pas toujours contemporaines. Dans certains cas assez rares, on distingue les premiers mélanocytes dès le stade des ébauches dermiques. Dans la plupart des cas, les mélanocytes ne sont visibles qu'au stade des jeunes germes plumaires.

Au stade 0 (6 jours d'incubation), les fragments de peau ne sont donc pas encore pigmentés. Il en est de même de la majorité des fragments de stade 1 (6 jours 3/4) ; quelques-uns d'entre eux, pourtant, présentent déjà quelques mélanocytes (une dizaine, au plus, par ébauche plumaire). Au stade 2 (7 à 8 jours 1/2), les fragments sont en général d'autant plus pigmentés que la taille des germes plumaires est plus grande. On peut dresser une correspondance approximative entre la taille du germe plumaire et le nombre de mélanocytes qu'il contient. En voici quelques termes, à titre d'exemple (fig. 92, 93 et 94, Pl. IV).

Germe plumaire de 0,02 mm	10 à 20 mélanocytes.
— — 0,1 mm	100 —
— — 0,3 mm	300 à 500 —

Quel que soit le stade de la peau, la très grande majorité des mélanocytes est concentrée dans les germes plumaires. Rares sont ceux qui se trouvent disséminés dans la peau en dehors des germes. Histologiquement, la plupart d'entre eux sont groupés à la base de l'épiderme. Un petit nombre est dispersé dans la profondeur du derme.

Toutes les expériences ont été faites sur des fragments de peau de stade 2, comportant des germes plumaires de 0,02 à 0,1 mm de long. Au moment de l'explantation, la pigmentation des fragments varie de 5 à plus de 300 mélanocytes. Elle est précisée pour chaque série d'expériences.

1. Pigmentation normale « in vitro » des fragments de peau de la race noire d'Alsace. — a. *Culture sur le milieu standard.* — L'extrait embryonnaire qui entre dans la composition du milieu standard utilisé pour ces expériences provient d'embryons de la race Noire d'Alsace de 9 jours d'incubation.

Nous avons vu, au chapitre II, qu'un fragment de peau, explanté au stade 0, ne se différencie pas et reste plat. Pourtant, l'épiderme, bien que souvent très étreint, se charge de nombreux mélanocytes étoilés. Après quelques jours, la peau se nécrosant, les mélanocytes s'arrondissent, prennent un aspect globuleux et finissent par lâcher leurs grains de mélanine dans l'épiderme. Celui-ci reste profondément et uniformément pigmenté. La différenciation des mélanocytes est donc indépendante de celle des germes plumaires.

Lorsqu'elle est explantée au stade 1 ou 2, la peau poursuit sa morphogénèse et continue de se pigmenter *in vitro*. Le fragment de peau se couvre de germes plumaires. Après 1 à 2 jours de culture, pour les explants de stade 1, et, dès l'explantation, pour ceux de stade 2, on voit apparaître dans la papille dermique des mélanocytes typiques, de forme pseudopodiale, à protoplasme se chargeant progressivement de grains de mélanine. Le nombre des mélanocytes augmente rapidement pendant que le germe s'accroît. Ils se différencient à la base du germe et sont entraînés avec les tissus du germe à mesure que celui-ci s'allonge (P. SENDEL, 1955, a et b) (fig. 92 et 95, Pl. IV).

Quarante explants de stade 2/0,02 mm, dont le degré de pigmentation au moment de l'explantation est en moyenne de 12 mélanocytes par germe, ont atteint, après 5 jours de culture sur le milieu standard, une pigmentation moyenne de 459 mélanocytes par germe (fig. 24).

La race des embryons servant à préparer l'extrait embryonnaire influence-t-elle sur la pigmentation de la peau *in vitro* ? Nous avons cultivé des fragments controlatéraux de stade 2/0,02 mm, d'une part, sur le milieu témoin à base d'extrait d'embryons de la race Noire d'Alsace, d'autre part, sur un milieu à base d'extrait d'embryons de la race Leghorn blanche. Les deux extraits proviennent d'embryons de 9 jours d'incubation. Après 5 jours de culture, le degré de pigmentation atteint sur l'un et l'autre milieu est sensiblement le même (410 mélanocytes par germe en moyenne pour 12 fragments cultivés sur le milieu « race noire », et 431 mélanocytes en moyenne pour 12 fragments explantés sur le milieu « race blanche »). La différence entre les deux degrés de pigmentation ne dépasse pas les limites des erreurs d'appréciation de la pigmentation. De plus, l'aspect des mélanocytes est le même sur les deux milieux.

L'extrait embryonnaire de la race Leghorn blanche est donc sans action sur la pigmentation *in vitro* d'un fragment de peau de la race Noire d'Alsace. P. C. KOLLER (1929), dans des cultures de cellules pigmentaires, avait déjà constaté que la nature de l'extrait embryonnaire et du plasma est sans effet sur la pigmentation.

b. *Culture sur le milieu T.* — L'extrait embryonnaire est-il indispensable à la différenciation des mélanocytes *in vitro* ? Les expériences montrent qu'il ne l'est pas, mais qu'il a une influence stimulatrice très importante.

Le graphique (fig. 24) montre le degré moyen de pigmentation atteint par 55 fragments de peau de stade 2/0,02 mm cultivés sur le milieu T (1). Les germes plumaires des explants sont environ quatre fois moins pigmentés que ceux cultivés sur le milieu standard (110 contre 459 mélanocytes par germe), bien que leur taille soit à peu près la même sur les deux milieux (fig. 96 et 97, Pl. IV).

2. *Influence des acides aminés de la solution B sur la pigmentation.* — Nous avons étudié le rôle des acides aminés de la solution B de Ét. WOLFF (1953) sur la pigmentation *in vitro* des fragments de peau de la race Noire d'Alsace. Rappelons que cette solution contient l'arginine, la cystéine, la méthionine, l'acide glutamique, la lysine, l'histidine, l'acide aspartique, la proline et le tryptophane.

Toutes les expériences sont faites sur des paires de fragments controlatéraux de stade 2/0,02 mm, dont l'un est explanté sur le milieu à éprouver et l'autre sur le milieu T témoin. Le degré moyen de pigmentation, au moment de la mise en culture, est de 12 mélanocytes par germe.

a. *Milieux B 1/2 et B 1/10.* — Dans une première série d'expériences, les 9 acides aminés de la solution B sont incorporés simultanément dans les milieux de culture, aux concentrations 1/2 et 1/10 (voir chap. I). Les milieux B 1/2 et B 1/10 ainsi constitués sont de puissants inhibiteurs de la pigmentation (fig. 24). En effet, le degré de pigmentation des fragments reste pratiquement stationnaire pendant les 5 jours de culture sur le milieu B 1/2. Les germes plumaires qui se développent sont à peine pigmentés ; seul leur apex comporte les quelques grains de mélanine élaborés par les mélanocytes qui s'étaient différenciés avant l'explantation (fig. 98 et 99, Pl. IV). Sur le milieu B 1/10, l'inhibition est à peine moins forte : le degré de pigmentation passe en 5 jours de culture de 12 à 19 mélanocytes par germe (voir tableau IX). Les témoins controlatéraux cultivés sur le milieu T atteignent respectivement un degré de pigmentation de 112 et de 100 mélanocytes par germe.

(1) Les fragments cultivés sur le milieu T ne sont pas les témoins controlatéraux des explants cultivés sur le milieu St. On a pris soin, cependant, de ne comparer entre eux que des fragments dont le degré de pigmentation est sensiblement le même au départ (voisin de 12 mélanocytes par germe).

b. *Milieux plus simples que le milieu B.* — Quels sont les acides aminés de la solution B qui sont responsables de l'inhibition de la différenciation

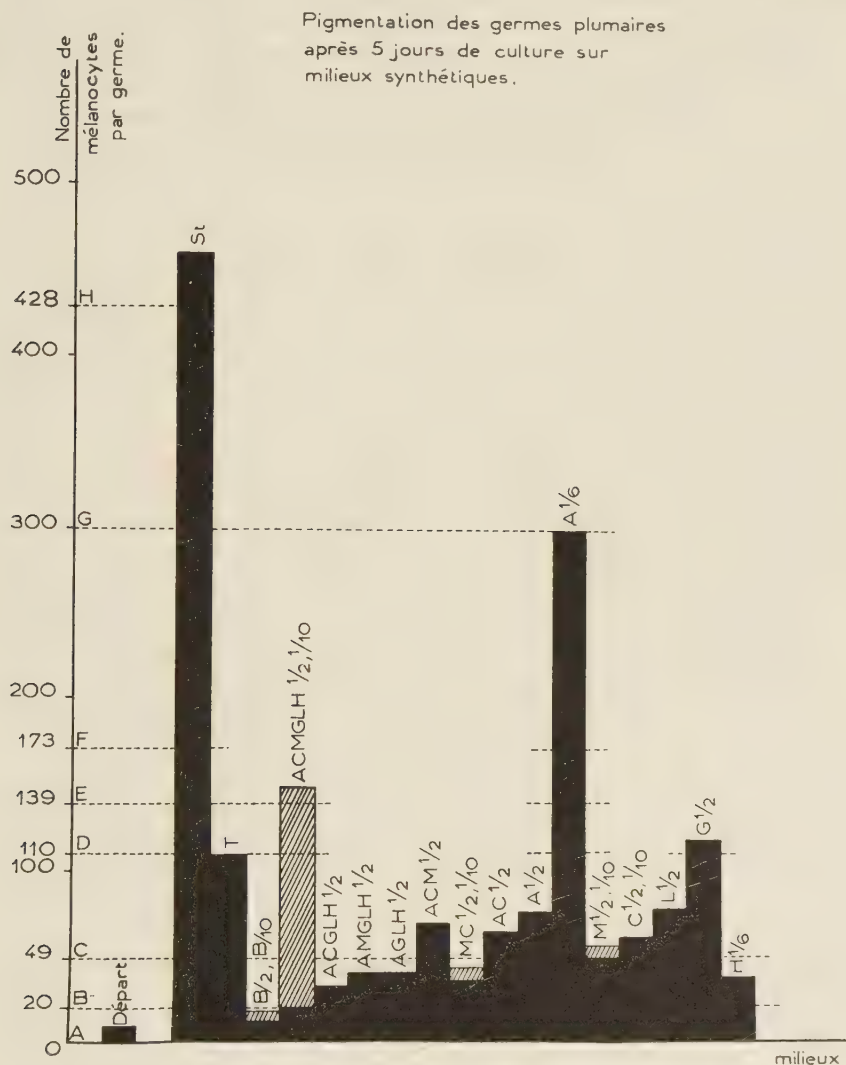


FIG. 24. — Pigmentation des germes plumaires de la race Noire d'Alsace, après 5 jours de culture sur le milieu standard et sur divers milieux synthétiques.

St, milieu standard ; T, milieu contenant uniquement une solution physiologique glucosée ; B, milieu synthétique constitué d'arginine (A), de cystéine (C), de méthionine (M), d'acide glutamique (G), de lysine (L), d'histidine (H), d'acide aspartique, de proline et de tryptophane.

des mélanocytes ? Nous avons tout d'abord supprimé l'acide aspartique, la proline et le tryptophane qui s'étaient déjà révélés défavorables pour la croissance du germe plumaire. Le milieu ACMGLH 1/2 qui en résulte

est encore très inhibiteur de la pigmentation (voir tableau IX). Par contre, employé à la concentration 1/10, le milieu ACMGLH 1.10 permet une bonne différenciation des mélanocytes surpassant quelque peu celle qu'on obtient sur le milieu T (150 contre 110 mélanocytes par germe). Cette différence entre les deux milieux ACMGLH peut s'expliquer de deux manières différentes : 1° le milieu ACMGLH contient un ou plusieurs acides aminés qui perdent leur pouvoir inhibiteur à faible concentration : 2° il contient, au contraire, un ou plusieurs acides aminés qui, à faible concentration, favorisent la pigmentation.

TABLEAU IX. — PIGMENTATION DES FRAGMENTS DE PEAU DE RACE NOIRE D'ALSACE EXPLANTÉS SUR DIFFÉRENTS MILIEUX SYNTHÉTIQUES AU STADE 2/0,02mm (1).

NOMBRE DE PAIRES D'EXPLANTS.	MILIEU ÉPROUVÉ.		MILIEU TÉMOIN T.
	Désignation du milieu (2).	Degré de pigmentation en mélanocytes/germe.	Degré de pigmentation en mélanocytes/germe.
20	B 1/2	13	112
20	B 1/10	19	100
28	ACMGLH 1/2	21	130
28	ACMGLH 1/10	150	110
15	ACGLH 1/2	34	97
15	AMGLH 1/2	41	105
15	AGLH 1/2	41	118
15	ACM 1/2	70	103
15	MC 1/2	35	115
15	MC 1/10	42	123
15	AC 1/2	65	82
20	A 1/2	77	90
20	A 1/6	300	112
20	M 1/2	50	147
20	M 1/10	55	134
20	C 1/2, 1/10	62	108
15	L 1/2	79	89
15	G 1/2	119	103
15	H 1/6	39	84
			Moy. : 110

(1) Tous les fragments ont, au départ, un degré moyen de pigmentation de 12 mélanocytes par germe plumaire.

(2) A = arginine, C = cystéine, M = méthionine, G = acide glutamique, L = lysine, H = histidine ; les milieux B contiennent ces six acides aminés et l'acide aspartique, la proline et le tryptophane.

Par ailleurs, il convient de noter qu'une telle différence n'existe pas entre les milieux B 1/2 et B 1/10, tous deux inhibiteurs puissants de la pigmentation. L'association des trois acides aminés, acide aspartique, proline et tryptophane, peut donc être considérée comme néfaste pour la différenciation des mélanocytes.

Afin de préciser le rôle des constituants du milieu ACMGLH, nous avons éprouvé systématiquement les milieux contenant de 1 à 5 acides aminés et dont la composition correspond aux 62 combinaisons possibles

des 6 acides aminés employés isolément ou en groupe de 2, 3, 4 et 5 acides aminés. Le tableau IX et la figure 24 donnent un extrait des résultats obtenus. Nous n'y avons fait figurer que les milieux dont l'action sur la pigmentation de la peau permet de mieux comprendre celle des milieux ACMGLH 1/2 et 1/10 et de distinguer, parmi ses 6 acides aminés, ceux qui favorisent et ceux qui inhibent la synthèse de la mélanine.

Le graphique montre nettement que la plupart des milieux, qu'ils soient constitués d'un ou de plusieurs acides aminés, sont inhibiteurs de la pigmentation. L'acide glutamique (milieu G 1/2) et l'arginine (milieu A 1/6) font exception. L'acide glutamique semble inactif ; la pigmentation sur le milieu G 1/2 atteint le même degré que sur le milieu T. L'arginine, par contre, favorise beaucoup la différenciation des mélanocytes qui, au bout de 5 jours de culture, sont trois fois plus nombreux que sur le milieu T (fig. 102 et 103, Pl. IV). Remarquons que le milieu A 1/2, s'il n'est guère inhibiteur, n'a pas cette influence stimulatrice de la pigmentation.

La cystéine et la méthionine sont particulièrement nuisibles (fig. 100 et 101, Pl. IV) ; leur action inhibitrice n'est pas atténuée par une diminution de leur concentration. Les milieux MC 1/2 et MC 1/10, où la cystéine et la méthionine sont utilisées simultanément, ont un effet inhibiteur encore plus marqué. L'addition d'arginine à ces deux acides aminés réunis (milieu ACM 1/2) ne modère que faiblement l'inhibition. Il ne suffit pas de supprimer la cystéine et la méthionine dans le milieu ACMGLH 1/2 pour obtenir une bonne pigmentation : le milieu AGLH 1/2 tient vraisemblablement son pouvoir inhibiteur de l'histidine qui, employée seule (milieu H 1/6), est également défavorable à la pigmentation, alors que la lysine (milieu L 1/2) ne l'est que faiblement.

Le milieu ACMGLH contient, par conséquent, 3 acides aminés inhibiteurs, la cystéine, la méthionine et l'histidine, dont l'effet ne diminue pas lorsqu'on les utilise à la concentration 1/10 ou 1/6. Il renferme 2 acides aminés sans action notable sur la pigmentation, la lysine et l'acide glutamique ; et un acide aminé très favorable, l'arginine, à condition de l'utiliser à une concentration comprise entre 1/6 et 1/10. C'est donc bien l'arginine qui est responsable du caractère favorable du milieu ACMGLH utilisé à la concentration 1/10. En présence de la lysine et de l'acide glutamique, l'arginine est capable, dans le milieu ACMGLH 1/10, de contrecarrer l'action des 3 acides aminés inhibiteurs.

On sait que la synthèse de la mélanine est le résultat d'une oxydation enzymatique catalysée par l'ion Cu^{++} (A. B. LERNER et T. B. FITZPATRICK, 1950; D. KERTESZ, 1953; R. GONNARD et C. ALLUCHON, 1954). L'action inhibitrice de la cystéine et de la méthionine est vraisemblablement due à leur atome de soufre capable de bloquer l'ion Cu^{++} ; l'oxydase privée de cuivre serait incapable d'agir.

Il n'est guère possible, sur la base de nos connaissances actuelles du mécanisme de la mélanogenèse, d'expliquer les effets favorables de l'arginine, et les effets défavorables de l'histidine.

c. Milieux contenant la tyrosine. — A la suite de B. BLOCH (1917, *a* et *b*) et de H. S. RAPER (1932), de nombreux auteurs (A. B. LERNER et T. B. FITZPATRICK, 1950, 1953 ; A. S. BAKER, 1953 ; D. KERTESK, 1953 ; H. S. MASON, 1953, 1956 ; E. F. TRAUB et H. J. SPOOR, 1953, et d'autres) ont analysé et démontré le rôle de la tyrosine dans la synthèse de la mélanine chez les Batraciens, les Oiseaux et les Mammifères. Sous

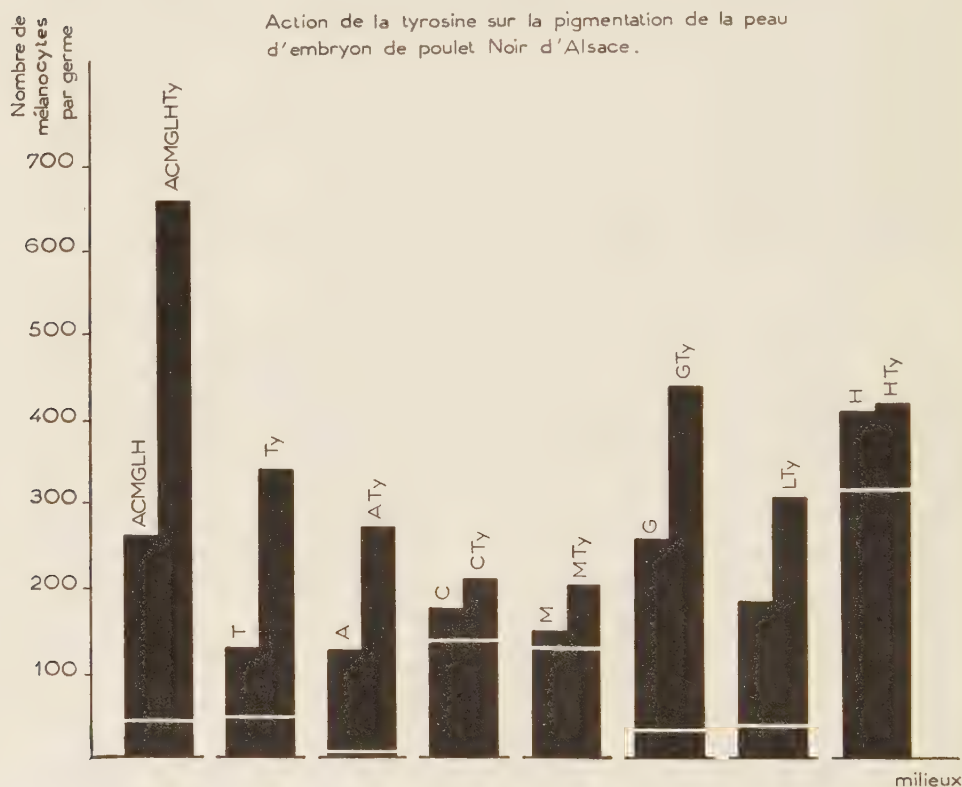


FIG. 25. — Action de la tyrosine sur la pigmentation de la peau de la race noire d'Alsace, cultivée sur divers milieux synthétiques. Le nombre de mélanocytes par germe plumaire, au moment de l'explantation, est indiqué sur les colonnes par un trait blanc horizontal.

A, arginine ; *C*, cystéine ; *G*, acide glutamique ; *H*, histidine ; *L*, lysine ; *M*, méthionine ; *T*, milieu constitué uniquement d'une solution physiologique glucosée ; *Ty*, tyrosine.

l'influence d'une oxydase spécifique, la tyrosinase, cet acide aminé est oxydé, après plusieurs étapes intermédiaires, en indole-5,6-quinone dont la polymérisation en présence d'oxygène conduit à la mélanine.

Trois substances au moins sont donc nécessaires à la formation de la mélanine : 1° un complexe protéique cuivré, la tyrosinase ; 2° un substratum, la tyrosine (ou encore la 3,4-dihydroxyphénylalanine qui en est le premier terme d'oxydation) ; 3° de l'oxygène.

L'addition de tyrosine dans nos milieux de cultures synthétiques

augmente-t-elle la pigmentation des fragments de peau de la race Noire d'Alsace ? La tyrosine est-elle capable de lever l'inhibition qu'exercent certains acides aminés ?

Pour répondre à ces questions, nous avons ajouté de la tyrosine, à la concentration de 0,16 mg pour 100 cm³ de liquide de Tyrode, aux milieux T, ACMGLH (1), A, C, M, G, L et H. Dans chacune de ces 8 séries, l'un des fragments d'une paire est explanté sur le milieu additionné de tyrosine, le témoin controlatéral est cultivé sur le même milieu sans tyrosine. Les résultats obtenus dans ces 8 séries ne peuvent être comparés entre eux, car le degré de pigmentation au moment de l'explantation varie d'une série à l'autre.

TABLEAU X. — ACTION DE LA TYROSINE SUR LA PIGMENTATION DES FRAGMENTS DE PEAU DE RACE NOIRE D'ALSACE CULTIVÉS EN MILIEUX SYNTHÉTIQUES (1) PENDANT 5 JOURS.

NOMBRE DE PAIRES D'EXPLANTS.	DEGRÉ DE PIGMENTATION AU MOMENT DE L'EXPLANTATION, EN MÉLANO-CYTES/GERME.	DÉSIGNATION DU MILIEU.	DEGRÉ DE PIGMENTATION EN MÉLANO-CYTES/GERME.	AUGMENTATION DE LA PIGMENTATION SOUS L'INFLUENCE DE LA TYROSINE.
20	46	T Ty	133 341	156 p. 100
20	42	ACMGLH ACMGLHTy	266 661	148 p. 100
15	5	A ATy	128 273	113 p. 100
15	32	G GTy	259 441	70 p. 100
15	37	L LTy	188 312	66 p. 100
15	127	M MTy	148 210	42 p. 100
15	135	C CTy	179 218	22 p. 100
15	313	H HTy	411 418	2 p. 100

(1) Les acides aminés de la solution B sont employés à la concentration 1/10. La concentration de la tyrosine est de 0,16 mg pour 100 cm³ de liquide de Tyrode.

Le graphique (fig. 25) et le tableau X montrent que, dans l'ensemble, la tyrosine améliore nettement la pigmentation des fragments de peau. Pourtant la tyrosine n'agit pas toujours avec la même efficacité selon

(1) Dans ces expériences, tous les acides aminés de la solution B sont employés à la concentration 1/10.

qu'elle est associée avec tel ou tel acide aminé. Les milieux synthétiques éprouvés peuvent se répartir en trois catégories :

1° Les milieux dont la tyrosine exalte les propriétés stimulatrices de la pigmentation (fig. 104 et 105, Pl. IV). Ce sont les milieux T, ACMGLH et A. Ces milieux, nous l'avons vu, sont d'emblée favorables à la différenciation des mélanocytes. La tyrosine qu'on leur ajoute est capable d'exercer pleinement son action sur la synthèse de la mélanine. Sur le milieu Ty ou ACMGLHTy, les germes plumaires se pigmentent presque avec la même intensité que sur le milieu standard (fig. 104 et 105, Pl. IV).

2° Les milieux dont le caractère inhibiteur est peu, ou n'est pas contre-carré par la présence de la tyrosine. Les fragments de peau cultivés sur ces milieux (CTy, MTy et HTy) ne se pigmentent guère plus que sur les milieux témoins C, M et H.

3° Les milieux auxquels la tyrosine ne confère qu'une faible action stimulatrice sur la synthèse du pigment. Ce sont les milieux G et L dont nous avons déjà vu qu'ils sont à peu près sans influence sur la pigmentation.

La tyrosine, en l'absence de tout autre acide aminé, est donc capable d'augmenter la pigmentation d'un fragment de peau de race pigmentée. En présence des autres acides aminés, pris un à un, cette action stimulatrice se trouve plus ou moins affaiblie, selon le caractère propre de l'acide aminé auquel elle est ajoutée. Associée, dans le milieu ACMGLHTy, à tous les acides aminés étudiés, la tyrosine est à même de vaincre l'inhibition exercée par les acides aminés sulfhydrylés, ce qui peut être dû à la présence favorable de l'arginine.

Nos résultats rejoignent ceux de J. W. SAUNDERS, Jr., W. C. QUEVEDO, L. PIERRO et F. E. MORBECK (1955) qui ont cultivé de la peau d'embryons de la race Plymouth Rock barrée sur des milieux naturels et synthétiques additionnés de tyrosine. Ils ont observé des mélanocytes plus nombreux, plus grands et plus sombres que ceux des cultures témoins sans tyrosine. Il est vraisemblable que, dans leurs expériences comme dans les nôtres, les mélanoblastes utilisent l'excédent de tyrosine que leur apporte le milieu pour faire la synthèse de la mélanine.

B. — Race blanche.

La peau des embryons de poulet de la race Leghorn blanche, que l'on préleve entre 6 et 8 jours 1/2 d'incubation, n'est pas pigmentée. Les fragments de peau des stades 1 et 2 sont donc toujours dépourvus de mélanocytes au moment de l'explantation.

1. *Culture sur milieu standard.* — Au cours de la culture des fragments de peau de la race Leghorn blanche sur le milieu standard, on voit apparaître quelques mélanocytes dans certains fragments. D'autres fragments ne se pigmentent jamais, même si l'on prolonge la culture

pendant plusieurs semaines. Les mélanocytes des fragments qui se pigmentent apparaissent, après 2 à 4 jours de culture, à la base des germes plumaires. Ils ne sont pas très nombreux (jamais plus de 50 par germe), mais sont de forme typique étoilée et se chargent progressivement de grains de mélanine. Ils déposent rarement leurs granulations pigmen-

Pigmentation de la peau d'embryons
Leghorn blanc cultivée sur milieu Standard.

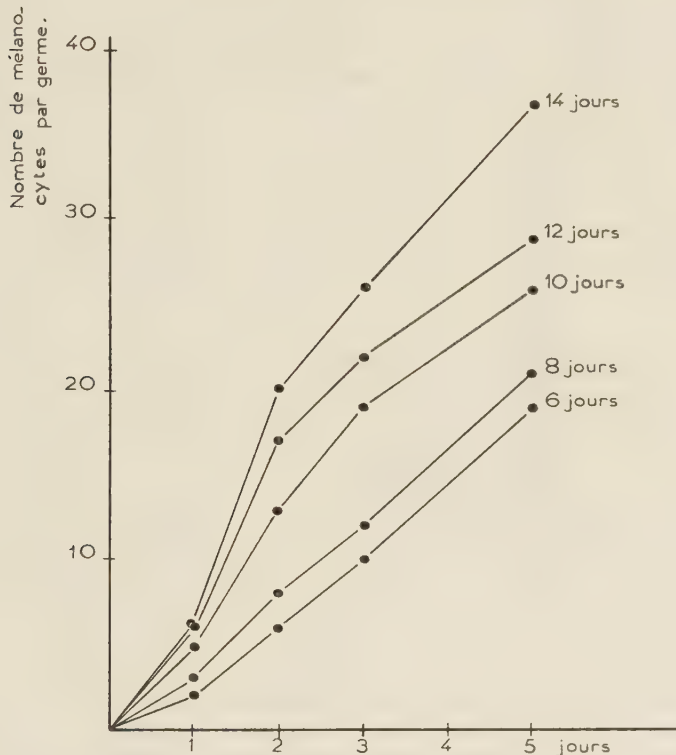


FIG. 26. — Action de l'extrait d'embryons de 6, 8, 10, 12 et 14 jours d'incubation sur la pigmentation *in vitro* de la peau de la race Leghorn blanche.

taires dans l'épiderme et finissent par se contracter en prenant un aspect globuleux (cf. H. L. HAMILTON, 1940).

Nous avons étudié l'influence de l'âge des embryons servant à préparer l'extrait embryonnaire sur la pigmentation de la peau. Les extraits embryonnaires sont obtenus à partir d'embryons de poulet de la race Leghorn blanche âgés de 6, 8, 10, 12 et 14 jours d'incubation. Cinq fragments de peau de stade 2/0,02 mm sont prélevés dans la région lombaire de 12 embryons et sont explantés sur les cinq types de milieu standard.

La courbe (fig. 26) montre que la pigmentation des explants augmente avec l'âge des embryons fournissant l'extrait embryonnaire. Sur le milieu

à base d'extrait d'embryons de 14 jours, par exemple, le nombre des mélanocytes, après 5 jours de culture, est environ deux fois plus élevé que sur le milieu qui contient l'extrait d'embryons de 6 jours ($P < 0,01$).

Ainsi, dans la peau de certains embryons de la race Leghorn blanche, un petit nombre de mélanoblastes parvient à synthétiser de la mélanine. D'autres embryons, par contre, fournissent des explants qui ne se pigmentent pas, même lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu contenant de l'extrait d'embryons de 14 jours.

Ces résultats indiquent qu'il est possible de stimuler *in vitro* la pigmentation du Leghorn blanc en modifiant convenablement la composition du milieu. Ils engagent à éprouver d'autres milieux qui seraient capables de provoquer la différenciation des mélanocytes de *tous* les fragments de peau.

Les essais de remplacement de l'extrait d'embryons de la race Leghorn blanche par de l'extrait d'embryons de la race Noire d'Alsace se sont soldés par un échec (cf. P. C. KOLLER, 1929). Sur l'un et l'autre milieux, les fragments de peau se pigmentent de la même manière ou ne se pigmentent pas. Le nombre des mélanocytes n'est pas accru par la présence dans le milieu de l'extrait d'embryons de race noire.

2. Culture sur milieux synthétiques. Influence de la tyrosine. —

Sur le milieu T, les fragments de peau de stade 2/0,02 mm ne se pigmentent que très faiblement (en moyenne 7 mélanocytes par germe). Sur le milieu B 1/2, aucun mélanocyte n'apparaît jamais.

Dans une première expérience, 32 fragments de peau de stade 2/0,02 mm sont cultivés sur le milieu T additionné de tyrosine, milieu Ty (1). Les témoins controlatéraux sont explantés sur le milieu T sans tyrosine. Une deuxième expérience comporte 35 fragments de stade 2/0,02 mm explantés sur le milieu B 1/2 additionné de tyrosine, milieu B 1/2 + Ty (1). Les témoins controlatéraux sont cultivés sur le milieu B 1/2.

Dans les deux expériences, les résultats obtenus après 5 jours de culture sont extrêmement frappants. La pigmentation des fragments de peau cultivés sur les milieux contenant la tyrosine est très intense (fig. 27). Sur le milieu Ty, on voit apparaître en moyenne 57 mélanocytes par germe (contre 7 sur le milieu T). En présence des acides aminés du milieu B 1/2, l'action de la tyrosine est plus énergique encore : 115 mélanocytes se différencient en moyenne dans chaque germe des fragments cultivés sur le milieu B 1/2 + Ty, alors que les témoins sur le milieu B 1/2 ne se pigmentent pas du tout.

Les mélanocytes qui se différencient en la présence de tyrosine sont tout à fait semblables à ceux de la race Noire d'Alsace. Ce sont de grandes cellules branchues, de 10 à 15 μ de diamètre, dont le cytoplasme est bourré de granulations de mélanine noire (fig. 109 et 110, Pl. IV). En fin de culture, ces mélanocytes commencent à déposer leur pigment dans

(1) Dans ces expériences, la tyrosine est employée à la concentration de 2 mg pour 100 cm³ de liquide de Tyrode.

les cellules épidermiques (fig. 111, Pl. IV), comme le feraient les cellules pigmentaires de la race noire. Les fragments de peau de la race blanche, particulièrement ceux cultivés sur le milieu B 1/2 + Ty, prennent ainsi l'aspect d'un fragment de peau de race noire. En effet, le degré de pigmentation (115 mélanocytes par germe) est du même ordre de grandeur que celui d'un fragment de peau de la race noire cultivée sur le milieu T.

Il est curieux de voir que la tyrosine agit efficacement lorsqu'on l'emploie avec les acides aminés de la solution B, pourtant inhibiteurs dans leur ensemble. La tyrosine est capable non seulement d'enrayer l'effet inhibiteur du milieu B 1/2, mais encore de profiter, en quelque sorte, de la présence des autres acides aminés. En synergie avec ces derniers, elle provoque une différenciation des mélanocytes beaucoup plus importante que celle qu'on obtient en l'employant seule dans le milieu Ty.

L'action de la tyrosine, dans le cas de la race Noire d'Alsace, pouvait s'expliquer par une accélération de la synthèse de la mélanine au sein des mélanocytes. Dans le cas de la race Leghorn blanche, on assiste, en la présence de tyrosine, à une pigmentation telle qu'il est difficile

de l'interpréter par une simple accélération de la réaction tyrosine-tyrosinase, car, normalement, les embryons ne se pigmentent que très peu ou, bien souvent, pas du tout. Il semble que la tyrosine apporte précisément à la peau de la race blanche l'un des facteurs qui lui manquent et dont l'absence expliquerait pourquoi la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes ne se fait pas ou se fait très peu dans cette race.

D. R. CHARLES et M. E. RAWLES (1940) ont décelé la présence de tyrosinase dans les germes plumaires d'embryons de races noires, mais non dans la peau des embryons Leghorn blancs. Ces auteurs pensent que la tyrosinase fait défaut à la peau de la race blanche ou qu'elle s'y trouve à l'état inactif.

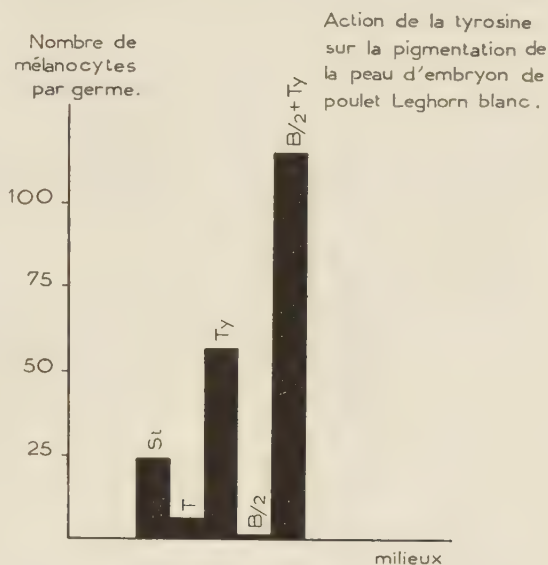


FIG. 27. — Action de la tyrosine sur la pigmentation *in vitro* de la peau d'embryon de la race Leghorn blanche, cultivée sur divers milieux synthétiques.

St, milieu standard ; T, milieu contenant uniquement une solution physiologique glucosée ; Ty, milieu contenant la tyrosine ; B/2, milieu contenant 9 acides aminés (arginine, cystéine, méthionine, acide glutamique, lysine, histidine, acide aspartique, proline et tryptophane) ; B/2 + Ty, milieu B/2 additionné de tyrosine.

Or, nos résultats ne peuvent se comprendre que si l'on admet la présence de tyrosinase dans les germes plumaires de la race blanche. Si elle y est normalement inactive, il faut penser qu'un excès de tyrosine suffit à lui rendre son activité. Il est possible que la peau de la race Leghorn blanche contient de la tyrosine libre en trop faible quantité pour permettre à tous les mélanoblastes de synthétiser de la mélanine.

3. *Action d'un oxydant : le bleu de Nil.* — L'apport d'oxygène à la peau en culture favorise-t-il l'oxydation enzymatique de la tyrosine ?

L'agent oxydant que nous avons utilisé est le sulfate de bleu de Nil Geigy. Le colorant n'est pas incorporé dans le milieu de culture, mais appliqué en marque colorée directement sur l'épiderme des fragments de peau, selon la technique décrite par V. HAMBURGER (1942).

Douze fragments de peau de stade 1 reçoivent chacun une ou plusieurs

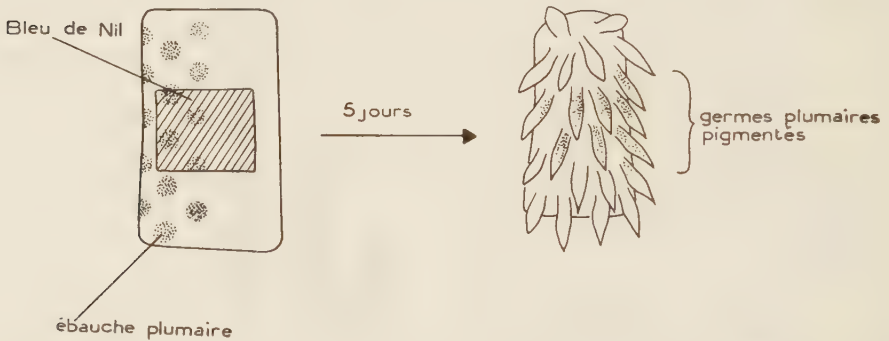


FIG. 28. — Action du sulfate de bleu de Nil, appliqué en marque colorée, sur la différenciation des mélanocytes de la race Leghorn blanche.

marques colorées carrées de 1 mm de côté environ et sont cultivés, avec leur témoin controlatéral non marqué, sur le milieu standard (fig. 28).

Le sulfate de bleu de Nil n'a aucune action sur la croissance des germes plumaires qui se différencient normalement. La marque bleue pâlit progressivement au cours de la culture et finit, dans certains cas, par disparaître complètement.

Après 5 jours de culture, 9 fragments sur 12 présentent, à l'emplacement même qu'occupait la marque bleue, un nombre appréciable de mélanocytes typiques étoilés et bourrés de granulations pigmentaires (les germes les plus pigmentés comptent plus de 50 mélanocytes). Les germes qui se dressent hors de la région marquée au bleu de Nil ne se sont pas pigmentés (fig. 107 et 108, Pl. IV). Parmi les témoins, 7 ne se sont pas pigmentés ; les 5 autres présentent au plus 10 mélanocytes par germe (fig. 106, Pl. IV). De plus, les mélanocytes des fragments témoins sont globuleux et petits, alors que ceux des explants colorés sont étalés et ramifiés.

Le bleu de Nil a donc une action stimulatrice très nette sur la différen-

ciation des mélanocytes. Cette action est toutefois bien plus modérée que celle de la tyrosine.

Il est fort probable que le bleu de Nil agit en tant qu'oxydant. En effet, la disparition de la marque colorée indique qu'il cède son oxygène aux cellules vivantes et se transforme en son leuco-dérivé. Il est vraisemblable que l'oxygène libéré par le bleu de Nil est utilisé directement pour l'oxydation de la tyrosine. Il est possible également que, dans le cas d'une oxydase inactive chez le Leghorn blanc, l'oxygène joue un rôle dans son activation.

Conclusions.

Les biochimistes cités plus haut, en étudiant les réactions qui conduisent de la tyrosine à la mélanine, avaient déjà démontré que, parmi de nombreux agents, la tyrosine et l'oxygène favorisaient la synthèse du pigment, les groupements sulfhydryles l'inhibaient.

La méthode de culture d'organes de Ét. WOLFF et K. HOFFEN (1952) nous a permis de mettre en évidence l'influence de la composition du milieu de culture sur la différenciation des mélanocytes et d'étudier l'action directe de certains acides aminés et du sulfate de bleu de Nil sur la pigmentation de la peau d'embryons de poulets de races noire et blanche.

La race des embryons servant à préparer l'extrait embryonnaire des milieux de culture n'a pas d'influence sur la pigmentation. L'extrait d'embryons de la race Leghorn blanche ne diminue pas la pigmentation d'un fragment de peau de la race Noire d'Alsace. Inversement, l'extrait d'embryons de la race Noire d'Alsace ne stimule pas la pigmentation de la peau de la race Leghorn blanche. L'âge (de 6 à 14 jours d'incubation) des embryons dont on prépare l'extrait, par contre, a une nette action sur le nombre de mélanocytes qui se différencient dans un explant de la race blanche. L'extrait est d'autant plus favorable à la pigmentation qu'il provient d'embryons plus âgés.

La tyrosine apparaît comme l'un des facteurs essentiels de la pigmentation. Non seulement cet acide aminé exalte la pigmentation déjà intense de la peau de la race noire, mais encore il détermine, dans un fragment de peau de la race Leghorn blanche, une pigmentation telle que la peau génétiquement blanche prend l'aspect d'une peau génétiquement pigmentée.

L'oxygène fourni par un oxydant, tel que le bleu de Nil, permet aussi à un assez grand nombre de mélanocytes de la race blanche de se charger de granulations de mélanine. Son action est bien moins forte que celle de la tyrosine, ce qui laisse à penser que la tyrosine est vraisemblablement l'un des facteurs qui font défaut à la peau de la race Leghorn blanche et dont l'absence permettrait de comprendre pourquoi la majorité des mélanocytes ne se différencient pas dans cette race.

Hormis la tyrosine, seule l'arginine, parmi les 9 acides aminés étudiés,

s'est révélée favorable à la pigmentation d'un fragment de peau de la race Noire d'Alsace. La lysine et l'acide glutamique sont sans action sur la genèse du pigment. Les autres acides aminés — particulièrement la cystéine, la méthionine et l'histidine — sont des inhibiteurs caractérisés. En leur présence, la synthèse de la mélanine est inhibée, et les explants restent pratiquement incolores.

La méthode de culture d'organes et les substances qu'on incorpore dans les milieux permettent, en définitive, d'obtenir de véritables phénocopies pigmentaires de la peau. La tyrosine transforme la peau de la race blanche en lui donnant l'aspect de la race noire. La cystéine, au contraire, confère à la peau de la race noire l'apparence de la race blanche.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'explantation de fragments de peau d'embryons de poulet sur des milieux de culture naturels et synthétiques selon la méthode de Ét. WOLFF et K. HAFEN (1952) permet d'étudier aisément la différenciation de la peau, la morphogenèse des germes plumaires et leur pigmentation.

D'une manière générale, les explants de peau ont tendance à se contracter dès la mise en culture, quels que soient la nature du milieu et l'âge des fragments. L'étrécissement des explants est d'autant plus important que le stade de l'explantation est plus précoce. Sur certains milieux (naturel standard, à base d'extrait embryonnaire, et synthétiques), et particulièrement dans le cas de fragments très jeunes (5 jours 1/2 à 6 jours 1/2 d'incubation), on observe une contraction très forte de l'épiderme, alors que le derme tend à s'étaler à la surface du milieu. Cela entraîne une grande disproportion entre la surface du derme et celle de l'épiderme : l'unité organique de l'explant s'en trouve détruite ; dans ces conditions, la morphogenèse des germes plumaires ne peut pas se réaliser.

Il ne suffit pourtant pas que la peau conserve en culture sa structure normale pour qu'elle se différencie. Les expériences mettent en évidence deux facteurs qui influent sur le développement *in vitro* des germes plumaires : 1° l'âge du fragment de peau au moment de l'explantation ; 2° la composition du milieu de culture.

Les fragments explantés avant l'apparition des ébauches plumaires (entre 5 jours 1/2 et 6 jours 1/2 d'incubation) ne différencient pas des germes plumaires lorsqu'ils sont explantés sur le milieu standard, même si l'on compense la contraction de l'épiderme en associant au derme un fragment d'épiderme environ quatre fois plus grand, au départ, que le fragment de derme.

Les fragments plus âgés (6 jours 3/4 à 8 jours 1/2 d'incubation) poursuivent leur morphogenèse *in vitro* et acquièrent des germes plumaires. La disposition des germes plumaires par rapport aux bords de l'explant varie selon le nombre de rangées d'ébauches plumaires que comporte le fragment au moment de l'explantation. Les fragments, découpés dans la région dorso-lombaire, de part et d'autre de la ligne médiodorsale de l'embryon (l'un des bords de l'explant coïncidant avec la ligne médiodorsale), présentent chacun, outre la demi-rangée médiodorsale, de 0 à 8 rangées d'ébauches plumaires, selon le stade du prélèvement.

Si le fragment compte plus de 4 rangées d'ébauches plumaires (7 jours 1/4 à 8 jours 1/2 d'incubation), les germes plumaires qui s'y développent conservent leur disposition primitive : la rangée située du côté interne de l'explant est la plus avancée dans sa différenciation.

Il n'en est pas de même d'un fragment prélevé entre 6 jours 3/4 et 7 jours d'incubation, et présentant au plus 4 rangées d'ébauches plumaires. On assiste, dans ce cas, à un complet remaniement des éléments dermiques de l'explant : les rangées d'ébauches plumaires, présentes au moment de l'explantation, commencent par disparaître ; il s'en forme bientôt de nouvelles dont la première se différencie approximativement à égale distance des deux bords longitudinaux de l'explant et non le long du bord interne. Il s'agit d'une véritable régulation au cours de laquelle le fragment réorganise ses structures à l'intérieur de ses limites : à partir d'une moitié droite ou gauche, il se refond un tout symétrique par rapport à un nouvel axe céphalo-caudal qui divise l'explant en deux parties droite et gauche semblables.

La composition du milieu de culture n'a que peu d'influence sur la morphogenèse des germes plumaires, sauf pour les fragments très jeunes indifférenciés (5 jours 1/2 à 6 jours 1/2 d'incubation). Il est possible d'obtenir la différenciation des germes plumaires à partir d'un fragment de peau indifférencié, soit en ajoutant du plasma de poulet au milieu standard, soit en remplaçant l'extrait embryonnaire du milieu standard par du plasma de poulet, soit encore en cultivant l'explant de peau en association avec un fragment d'un organe embryonnaire, tel que le tube neural, le foie, le poumon, le muscle cardiaque, le mésonéphros, l'intestin, l'encéphale ou la gonade. Le plasma de poulet et les organes associés semblent exercer sur le derme indifférencié une action inductrice non spécifique capable de déclencher la formation des ébauches plumaires dermiques. C. GROBSTEIN (1955, *a*) a observé une action inductrice semblable du tube neural sur la différenciation de tubules métanéphrétiques dans le mésenchyme rénal.

La culture des fragments de peau d'au moins 7 jours d'incubation sur des milieux synthétiques montre que le développement des germes plumaires se fait presque aussi bien sur ces milieux (contenant de 0 à 9 acides aminés) que sur le milieu standard à base d'extrait embryonnaire.

La survie des explants, par contre, est bien plus courte sur le milieu T (constitué uniquement d'une solution physiologique glucosée) que sur le milieu standard (4 jours contre 19 jours de survie, en moyenne). De plus, la kératinisation de l'épiderme ne se réalise qu'en culture prolongée au-delà de 10 jours sur le milieu standard.

Les cultures en milieux synthétiques mettent en évidence le rôle primordial du glucose, sans lequel aucune survie n'est possible, et l'action favorable de la cystéine, capable de prolonger la survie jusqu'au huitième jour de culture.

L'utilisation de la trypsine diluée (cf. A. MOSCONA, 1952), pour séparer parfaitement le derme de l'épiderme, permet de cultiver *in vitro* des associations « hétérochroniques » de derme et d'épiderme, et ainsi d'analyser les rôles respectifs des deux constituants de la peau.

Les expériences démontrent que le derme exerce sur l'épiderme trois actions distinctes : 1° le derme est responsable de la différenciation de

l'ectoderme unistratifié en épiderme typique à deux assises de cellules; il détermine la polarité « interno-externe » (assise basale - périderme) de l'épiderme ; 2° les ébauches plumaires dermiques induisent l'épiderme à s'épaissir et à commencer son excroissance ; 3° le derme impose à l'épiderme la qualité de sa différenciation : un fragment de derme dorsal induit des germes plumaires, un fragment de derme tarso-métatarsien induit des écailles dans l'épiderme.

L'épiderme joue deux rôles différents dans la morphogenèse des germes plumaires : 1° il détermine l'orientation des germes plumaires par rapport aux bords de l'explant ; les germes s'inclinent toujours vers le bord caudal du fragment d'épiderme, comme ils le font normalement chez l'embryon ; 2° le capuchon épidermique des jeunes germes plumaires est capable, après avoir subi l'impulsion de l'ébauche dermique, d'induire, à son tour, le derme à constituer l'axe mésodermique du germe.

On peut, en conséquence, décrire la différenciation de la peau de la manière suivante :

Première phase : Le derme provoque la différenciation de l'ectoderme en épiderme.

Deuxième phase : Sous l'influence d'un facteur non encore déterminé, mais émanant vraisemblablement de l'ensemble des tissus situés sous la peau, le derme différencie ses ébauches plumaires dermiques.

Troisième phase : Les ébauches plumaires dermiques exercent sur l'épiderme sus-jacent une brève action inductrice qui entraîne la première excroissance de l'épiderme. En même temps, le derme détermine, par sa nature, le caractère régional de la différenciation épidermique.

Quatrième phase : L'épiderme, en retour, induit les cellules dermiques à coloniser la gaine épidermique et fixe, par sa polarité céphalo-caudale, l'orientation des germes plumaires.

Le germe plumaire de l'embryon de poulet entre ainsi dans la grande famille des *bourgeons embryonnaires*, dont le développement résulte de l'interaction inductrice de deux ébauches, l'une épithéliale, l'autre mésenchymateuse. La littérature récente en fournit de nombreux exemples.

Dans le bourgeon de membre de l'embryon d'Oiseau, la cape apicale ectodermique est l'organisatrice de la croissance du membre ; le mésoderme en détermine la qualité d'aile ou de patte (E. ZWILLING, 1955), le caractère génétique (polydactyle ou non) (E. ZWILLING, 1956, *b*) et l'orientation de l'axe proximodistal (E. ZWILLING, 1956, *a*). A. HAMPÉ (1957) montre en outre que, dans les échanges du mésoderme et de l'ectoderme du bourgeon de patte entre le poulet et le canard, c'est le mésoderme qui est responsable du caractère générique du membre.

D'une revue d'ensemble concernant la genèse de l'oreille interne des Vertébrés (J. BENOIT, 1957), il ressort que l'édification de cet organe est le résultat de trois inductions successives : le mésoblaste céphalique parachordal d'abord, le rhombencéphale ensuite, induisent la formation de l'otocyste à partir de l'ectoderme ; l'otocyste, à son tour, détermine, dans le mésenchyme qui l'environne, la différenciation de la capsule cartilagineuse.

Des inductions réciproques analogues interviennent au cours de l'invagination des épithéliums glandulaires dans leur mésenchyme. C. GROBSTEIN (1955, *b*) montre que l'arborisation des tubules salivaires et métanéphrétiques de la souris se réalise sous l'influence morphogène des mésenchymes salivaire et rénal. De même, H. LUTZ et L. GOMOT (1956) mettent en évidence l'action inductrice du mésoderme caudal sur l'ectoderme dans la formation de la glande uropygienne du canard.

D'une manière générale, on peut penser avec C. GROBSTEIN (1955, *b*) que « *whenever two tissues of different developmental history come together and interact, there is something to learn about embryonic induction* ». Ainsi, il est fort probable que l'analyse du développement d'autres structures embryonnaires constituées d'une partie épithéliale et d'une partie mésenchymateuse révélerait des inductions réciproques semblables à celles qui viennent d'être décrites. Citons le follicule pileux (cf. H. B. CHASE, 1954), le bourgeon dentaire (cf. A. N. STUDITSKY, 1937 ; A. M. DALCQ, 1953 ; A. M. DALCQ et J. MULNARD, 1953 ; G. SZABÓ, 1954) et le bourgeon mammaire (cf. A. RAYNAUD et J. RAYNAUD, 1957), dont l'étude apporte les premiers arguments en faveur de l'interdépendance de l'ectoderme et du mésoderme.

Si la morphogenèse des germes plumaires est peu influencée par la constitution du milieu de culture, la différenciation des mélanocytes, par contre, montre une grande sensibilité à cet égard.

Le milieu standard est très favorable à la pigmentation des fragments de peau de la race Noire d'Alsace et de la race Leghorn blanche. Les explants de peau de la race noire se pigmentent d'une manière très intense ; ceux de la race blanche très peu, mais d'autant plus que l'extrait embryonnaire est préparé à partir d'embryons plus âgés. Avec l'extrait d'embryons de 14 jours, le nombre des mélanocytes par germe plumaire est environ deux fois plus grand qu'avec l'extrait d'embryons de 6 jours.

Parmi les acides aminés étudiés en culture sur des milieux synthétiques, la plupart sont des inhibiteurs de la pigmentation. En particulier, les acides aminés sulphydrylés, la cystéine et la méthionine, empêchent la synthèse du pigment dans les fragments de peau de la race noire. Les seuls acides aminés qui favorisent la pigmentation des explants de peau de la race noire sont l'arginine et surtout la tyrosine.

Il est possible de provoquer la différenciation des mélanoblastes de la race blanche en faisant agir la tyrosine. En la présence de cet acide aminé, les mélanocytes qui apparaissent dans les germes plumaires sont environ 10 fois plus nombreux que sur le milieu T dépourvu de tyrosine. La pigmentation obtenue est tout aussi intense que celle d'un fragment de peau de la race noire cultivé sur le milieu T. L'oxygène fourni à la peau de la race blanche par un oxydant, le bleu de Nil, augmente aussi le nombre des mélanoblastes qui se transforment en mélanocytes, mais son action est bien moins forte que celle de la tyrosine.

Ces résultats tendent à prouver que, des trois facteurs nécessaires à la synthèse de la mélanine, propigment, diastase et oxygène, un seul, le

propigment, fait défaut à la peau de la race blanche. En effet, contrairement à ce que pensent D. R. CHARLES et M. E. RAWLES (1940), la peau de la race blanche contient certainement de la tyrosinase, puisqu'elle est à même d'oxyder la tyrosine qu'on lui fournit en culture. Comme elle est également capable d'utiliser l'oxygène (d'un oxydant, par exemple), il semble que la seule raison pour laquelle la différenciation des mélanoblastes ne se réalise pas dans cette race soit l'absence de tyrosine libre dans la peau ou les cellules pigmentaires.

En définitive, des modifications simples de la composition du milieu de culture peuvent retentir d'une manière frappante sur la pigmentation des explants de peau. On provoque ou l'on empêche à volonté la synthèse de la mélanine dans les cellules pigmentaires de la race blanche ou de la race noire.

Résumé.

1. Les expériences exposées dans ce travail ont eu pour but d'analyser la différenciation de la peau et de ses dérivés épidermiques chez l'embryon de poulet. Les fragments de peau sont prélevés sur des embryons de 5 à 13 jours d'incubation. Ils sont cultivés *in vitro* sur des milieux naturels et synthétiques, selon la méthode de culture d'organes de Ét. WOLFF et K. HOFFEN (1952).

2. Trois stades de la différenciation de la peau de la région dorsale ont été décrits (fig. 37, 38 et 39, Pl. I) : stade 0 (6 jours d'incubation), stade 1 (6 jours $3/4$ d'incubation), stade 2 (7 jours $1/4$ à 8 jours $1/2$ d'incubation). En culture, les fragments de peau ont tendance à se contracter, l'épiderme s'étirant généralement plus vite que le derme (fig. 1). Sur le milieu standard, à base d'extrait embryonnaire, les fragments de peau de stade 0 ne se différencient pas, les fragments de stade 1 effectuent, avant de développer leurs germes plumaires, une réorganisation spatiale des ébauches plumaires par rapport à la topographie de l'explant, les fragments de stade 2 poursuivent leur morphogénèse normale sans interruption préalable (fig. 40, 41 et 42, Pl. I).

3. L'extrait embryonnaire n'est pas nécessaire à la différenciation des fragments de peau en culture. Sur le milieu synthétique T, constitué uniquement d'une solution physiologique glucosée, les fragments de peau de stades 1 et 2 poussent des germes plumaires qui sont pourtant moins nombreux et moins longs que sur le milieu standard (fig. 2). Le glucose, par contre, est indispensable à la survie des fragments de peau.

4. L'addition de 9 acides aminés (solution B) au milieu T allonge la survie des explants, mais n'améliore pas la croissance des germes plumaires (fig. 3). Pourtant, parmi ces 9 acides aminés, la cystéine, employée seule, joue un rôle important dans la morphogénèse des structures épidermiques (fig. 4). Dans le cas d'un milieu pauvre en glucose, la cystéine pallie les effets de cette déficience et permet une longue survie accompagnée d'une bonne différenciation des germes plumaires (fig. 5).

5. Lorsqu'ils sont associés en culture à des fragments d'organes embryonnaires (de tube neural, par exemple), les explants de peau de stade 0 se différencient et acquièrent de nombreux germes plumaires (fig. 6 ; fig. 44 et 45, Pl. I). Le tube neural tué à la chaleur conserve ce pouvoir inducteur de la différenciation des germes plumaires (fig. 46 et 47, Pl. I). Le plasma de poulet exerce la même action morphogène que les organes associés (fig. 8 et 9 ; fig. 48, 49, 51, 52 et 53, Pl. II). Le sérum de cheval n'a pas d'effet (fig. 10 ; fig. 50, Pl. II).

6. La culture de fragments de derme et d'épiderme de stades différents, préalablement séparés par l'action de la trypsine (fig. 58, 59 et 60, Pl. II), permet d'analyser l'activité des deux constituants de la peau au cours de l'édification du germe plumaire.

a. L'association d'épiderme de stade 0 et de derme de stade 1 se couvre de germes plumaires (fig. 11 ; fig. 55, Pl. II). L'association d'épiderme de stade 0 et de derme de stade 2 ne se différencie pas (fig. 12 ; fig. 54, Pl. II). Le derme exerce donc sur l'épiderme une courte action inductrice qui provoque l'excroissance des germes plumaires.

b. La différenciation des germes plumaires, dans le cas de l'association d'épiderme de stade 2 et de derme de stade 0, montre que l'épiderme différencié induit, à son tour, le derme à constituer l'axe mésodermique du germe plumaire (fig. 13 ; fig. 56 et 57, Pl. II). La greffe d'épiderme de stade 2 sur la face profonde du derme d'un fragment de peau confirme ces propriétés inductrices de l'épiderme en entraînant la formation d'une peau double avec des germes plumaires sur ses deux faces (fig. 14 ; fig. 61 à 64, Pl. II).

c. L'association de derme de stade 1 et d'ectoderme inversé (avec sa face externe tournée contre la face externe du derme) et l'association de derme de stade 1 et d'épiderme de stade 0 inversé (avec sa face périodermique tournée contre la face externe du derme) mettent en évidence l'action du derme sur l'histogenèse de l'épiderme (fig. 15 et 16 ; fig. 66 à 69, Pl. II). Sous l'influence du derme, l'ectoderme unistratifié se transforme en épiderme typique à deux couches de cellules, assise basale et périodermie. Si l'épiderme est déposé sur le derme avec sa face périodermique contre le derme, celui-ci est capable de remanier la polarité « interno-externe » de l'épiderme, de telle sorte que le périodermie se retrouve à la surface à la fin de la culture. Cette polarité se stabilise au cours du septième jour d'incubation et ne peut plus alors être inversée (fig. 17 ; fig. 65, 70 et 71, Pl. II).

d. Les associations de derme et d'épiderme, après rotation de 90° ou 180° de l'axe céphalo-caudal de l'épiderme par rapport à celui du derme, démontrent le rôle déterminant et exclusif de l'épiderme dans l'orientation des germes plumaires (fig. 18 ; fig. 72, 73 et 77, Pl. III). Les germes plumaires s'inclinent toujours vers le bord caudal du fragment d'épiderme, quelle que soit, par ailleurs, l'orientation du fragment de derme.

7. L'activité morphogène du derme et de l'épiderme est également

démontrée par les expériences d'association de derme ou d'épiderme dorsal avec des tissus non plumigènes.

a. Le derme dorsal de stade 1 induit la formation de germes plumaires dans l'épiderme de la crête (fig. 19 ; fig. 74, 76 et 79, Pl. III) et de la région tarso-métatarsienne de 12 jours d'incubation (fig. 20 ; fig. 81 à 84, 87 et 88, Pl. III). L'épiderme dorsal de stades 1 et 2 est capable de différencier des germes plumaires en association avec du mésenchyme sous-cutané (fig. 75, Pl. III) ou du derme tarso-métatarsien de 11 jours d'incubation (fig. 21). Au contraire, le mésenchyme pulmonaire ou mésonéphrétique (fig. 78 et 80, Pl. III) et le derme de la crête ne sont pas capables de répondre à l'induction épidermique.

b. Le derme de la région tarso-métatarsienne de 13 jours induit la différenciation d'écailles dans l'épiderme dorsal de stade 1 (fig. 22 ; fig. 85, 89, 90 et 91, Pl. III).

Ces expériences montrent que le derme détermine, par son caractère régional, la qualité de la différenciation épidermique.

8. La pigmentation de la peau de deux races (Noire d'Alsace et Leghorn blanche) est étudiée en culture *in vitro* sur le milieu standard et sur divers milieux synthétiques.

a. La différenciation des mélanocytes de la race noire se fait normalement sur le milieu standard (fig. 92 et 95, Pl. IV). Sur le milieu synthétique T, dépourvu de substances quaternaires, le nombre des mélanocytes est moins grand que sur le milieu standard (fig. 24 ; fig. 96 et 97, Pl. IV).

b. De nombreux acides aminés inhibent la pigmentation de la peau de la race noire cultivée sur milieux synthétiques (fig. 24 ; fig. 98 et 99, Pl. IV). Particulièrement la cystéine (fig. 100 et 101, Pl. IV), la méthionine et l'histidine sont de puissants inhibiteurs de la mélanogenèse ; lorsqu'elles sont employées seules, elles arrêtent la différenciation des mélanocytes. L'arginine (fig. 102 et 103, Pl. IV), par contre, et surtout la tyrosine favorisent la synthèse de la mélanine ; en la présence de la tyrosine seule, la pigmentation des explants est aussi intense que sur le milieu standard (fig. 25 ; fig. 104 et 105, Pl. IV).

9. Les fragments de peau de la race blanche ne se pigmentent que très peu sur le milieu standard. Les extraits d'embryons âgés sont plus favorables à la pigmentation que les extraits d'embryons jeunes (fig. 26).

a. Incorporée dans les milieux synthétiques, la tyrosine provoque, dans la peau de la race blanche, une pigmentation comparable à celle de la race noire. Les mélanocytes sont très nombreux, bien développés et chargés de mélanine (fig. 27 ; fig. 109 à 111, Pl. IV).

b. Un oxydant, le bleu de Nil, appliqué sur l'épiderme en marques colorées, déclenche la différenciation d'un nombre important de mélanocytes dans les fragments de peau de la race blanche (fig. 28 ; fig. 106 à 108, Pl. IV).

BIBLIOGRAPHIE

- BAKER (A. S.). — 1953. Some factors involved in melanin production in frog skin (Pigment Cell Growth, *Acad. Press, New York*, p. 221-229).
- BARTELS (E. A.). — 1943. Morphogenetische Wirkungen des Schilddrüsenhormons auf das Integument von Vogelembryonen (*Roux' Arch. Entw.-mech.*, **142**, p. 763-816).
- BENOIT (J.). — 1957. Sur un exemple de cascade d'inductions dans l'organogenèse des Vertébrés : la genèse de l'oreille interne (*Ann. biol.*, **33**, p. 385-412).
- BLASZYK (P.). — 1935. Untersuchungen über die Stammesgeschichte der Vogelschuppen und Federn und über die Abhängigkeit ihrer Ausbildung am Vogelfuss von der Funktion (*Gegenbaur's Morphol. Jb.*, **75**, p. 483-567).
- BLOCH (B.). — 1917 a. Chemische Untersuchungen über das spezifische Ferment der Haut, die Dopaoxydase (*Z. physiol. Chem*, **98**, p. 226-254). — 1917 b. Das Problem der Pigmentbildung in der Haut (*Z. ges. exp. Med.*, **5**, p. 179-263).
- BLOCH (B.) et SCHAAF (F.). — 1925. Pigmentstudien (*Biochem. Z.*, **162**, p. 181-206).
- CAIRNS (J. M.) et SAUNDERS (J. W., Jr.). — 1954. The influence of embryonic mesoderm on the regional specification of epidermal derivatives in the chick (*J. exp. Zool.*, **124**, p. 221-248).
- CHAMPY (C.). — 1933. Cultures de bulbes plumaires *in vitro* (*C. R. Soc. Biol.*, **113**, p. 1450-1452).
- CHARLES (D. R.) et RAWLES (M. E.). — 1940. Tyrosinase in feather germs (*Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **43**, p. 55-58).
- DALCQ (A. M.). — 1953. Ribonucléines et polysaccharides dans les ébauches dentaires des Rongeurs (*C. R. Soc. Biol.*, **147**, p. 2038-2040).
- DALCQ (A. M.) et MULNARD (J.). — 1953. — Localisation de la phosphatase alcaline dans les ébauches dentaires des Rongeurs (*C. R. Soc. Biol.*, **147**, p. 2040-2042).
- DANFORTH (C. H.). — 1929. The effect of foreign skin on the feather pattern in the common fowl (*Gallus domesticus*) (*Roux' Arch. Entw.-mech.*, **116**, p. 242-252). — 1937. Pigment cells in heterogeneous feathers (*Anat. Rec.*, **68**, p. 461-468). — 1939. Direct control of avian color pattern by pigmentoblasts (*J. Hered.*, **30**, p. 173-176).
- DAVIES (H. R.). — 1889. Die Entwicklung der Feder und ihre Beziehung zu anderen Integumentgebilden (*Morphol. Jb.*, **15**, p. 560-645).
- DELANNEY (L. E.). — 1941. The role of the ectoderm in pigment production, studied by transplantation and hybridization (*J. exp. Zool.*, **87**, p. 323-341).
- DORRIS (F.). — 1936. Differentiation of pigment cells in tissue cultures of chick neural crest (*Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **34**, p. 448-449). — 1938. The production of pigment *in vitro* by chick neural crest (*Roux' Arch. Entw.-mech.*, **138**, p. 323-334). — 1939. The production of pigment by chick neural crest in grafts to the 3-day limb bud (*J. exp. Zool.*, **80**, p. 315-345). — 1940. Behaviour of pigment cells from cultures of neural crest when grafted back into the embryo (*Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **44**, p. 286-287). — 1941. The behaviour of chick neural crest in grafts to the chorio-allantoic membrane (*J. exp. Zool.*, **86**, p. 205-224).
- DORRIS HUMM (F.). — 1942. The growth and migration of cultured melanophores from the neural crest when grafted into the embryo (*J. exp. Zool.*, **90**, p. 101-125).
- DUSHANE (G. P.). — 1944. The embryology of pigment cells. II. Birds (*Quart. Rev. Biol.*, **19**, p. 98-117).

- EASTLICK (H. L.). — 1939 *a*. A study of feather character in limbs transplanted between embryos of different bird species (*Proc. nat. Acad. Sci.*, **25**, p. 551-557). — 1939 *b*. The point of origin of the melanophores in chick embryos as shown by means of limb bud transplants (*J. exp. Zool.*, **82**, p. 131-157).
- FELL (H. B.). — 1951. Methods for study of organized growth *in vitro* (In : *Visscher, M. B., ed., Methods in medical research*, Chicago, the Year book publishers, inc., p. 233-237).
- FELL (H. B.) et MELLANBY (E.). — 1953. Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by high vitamin A (*J. Physiol.*, **119**, p. 470-488).
- FITZPATRICK (T. B.) et LERNER (A. B.). — 1953. Terminology of pigment cells (*Science*, **117**, p. 640).
- FOX (M. J.). — 1949. Analysis of some phases of melanoblast migration in the Barred Plymouth Rock embryos (*Physiol. Zool.*, **22**, p. 1-22).
- FRAPS (R. M.) et JUHN (M.). — 1936. Developmental analysis in plumage. III. Field functions in the breast tracts (*Physiol. Zool.*, **9**, p. 378-406).
- GERBER (A.). — 1939. Die embryonale und postembryonale Pterylose der Alektoromorphæ (*Rev. suisse Zool.*, **46**, p. 161-324).
- GONNARD (R.) et ALLUCHON (C.). — 1954. Étude sur le mécanisme de l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase (*Bull. Soc. Chim. biol.*, **36**, p. 1101-1113).
- GORDON (M.). — 1953. Pigment cell Growth. Proc. of the 3rd conference on the biology of normal and atypical pigment cell growth (*Acad. Press, New York*).
- GREITE (W.). — 1934. Die Strukturbildung der Vogelfeder und ihre Pigmentierung durch Melanine (*Z. wiss. Zool.*, **140**, p. 283-336).
- GROBSTEIN (C.). — 1955 *a*. Inductive interaction in the development of the mouse metanephros (*J. exp. Zool.*, **130**, p. 319-339). — 1955 *b*. Tissue interaction in the morphogenesis of mouse embryonic rudiments *in vitro*. Aspects of Synthesis and Order in Growth (*Princeton Univ. Press, Princeton, New-Jersey*, p. 233-256).
- GROPP (A.) et HILWIG (I.). — 1954. Ueber die Entwicklung der Dunenfederanlage des Hühnchenembryos *in vitro* (*Exp. Cell. Res.*, **7**, p. 291-302).
- HAFFEN (K.) et WOLFF (Ém.). — 1953. Sur les besoins nutritifs des gonades et de la syrinx des embryons d'oiseaux en culture sur milieux synthétiques (*C. R. Acad. Sci.*, **237**, p. 754-756).
- HAMBURGER (V.). — 1942. A manual of experimental embryology (*The Chicago Univ. Press*, p. 56).
- HAMBURGER (V.) et HAMILTON (H. L.). — 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo (*J. Morphol.*, **88**, p. 49-92).
- HAMILTON (H. L.). — 1940. A study of the physiological properties of melanophores with special reference to their role in feather coloration (*Anat. Rec.*, **78**, p. 525-547).
- HAMILTON (H. L.) et KONING (A. L.). — 1956. Effects of a phosphatase-inhibitor on the structure of the developing down-feather (*Amer. J. Anat.*, **99**, p. 53-80).
- HAMILTON (H. L.), SINSHEIMER (R. L.) et HINSCH (G. W.). — 1956. Inhibition of alkaline phosphatase and morphogenesis in feathers by extracellular RNA (*Anat. Rec.*, **125**, p. 628-629).
- HAMPÉ (A.). — 1957. Sur le rôle du mésoderme et de l'ectoderme du bourgeon de patte dans les échanges entre le Poulet et le Canard (*C. R. Acad. Sci.*, **244**, p. 3179-3181).
- HOLMES (A.). — 1935. The pattern and symmetry of adult plumage units in relation to the order and locus of origin of the embryonic feather papillæ (*Amer. J. Anat.*, **56**, p. 513-537).
- KAPEL (O.). — 1929. Einige Untersuchungen über das Verhalten des Epithels *in vitro* (*Arch. exp. Zellf.*, **8**, p. 35-129).
- KERTESZ (D.). — 1953. Étude sur la mélanogenèse : sur le mécanisme de l'oxydation de la tyrosine par la polyphénoloxydase (tyrosinase) (*Bull. Soc. Chim. biol.*, **35**, p. 993-1005).
- KIÉNY (M.). — 1958. Contribution à l'étude des besoins nutritifs des tibias embryonnaires d'Oiseau cultivés en milieux naturels et synthétiques (*Arch. Anat. micr. Morphol. exp.*, **47**, p. 85-169).

- KOLLER (P. C.). — 1929. Experimental studies on pigment formation. I. The development *in vitro* of the mesodermal pigment cells of the fowl (*Arch. exp. Zellf.*, **8**, p. 490-498).
- KONING (A. L.). — 1957. Histochemical localization of certain constituents of the developing juvenile wing feather (*Amer. J. Anat.*, **100**, p. 17-50).
- KONING (A. L.) et HAMILTON (H. L.). — 1954. Localization of enzyme systems, nucleic acids and polysaccharides during morphogenesis in the down feather of the chick. (*Amer. J. Anat.*, **95**, p. 75-107).
- KUHN (O.). — 1933. Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an der Vogelfeder (*Roux' Arch. Entw.-mech.*, **127**, p. 456-541).
- KUHN (O.) et KÆCKE (H. U.). — 1956. Das Schicksal der Melanoblasten im Integument verschiedener Taubenrassen (*Z. Zellf. mikr. Anat.*, **44**, p. 557-584).
- LEPORI (N. G.). — 1953. Recherches sur la différenciation *in vitro* de la peau et du pigment chez l'embryon d'Oiseaux (*Arch. Anat. micr. Morphol. exp.*, **42**, p. 194-208).
- LERNER (A. B.). — 1955. Melanin pigmentation (*Amer. J. Med.*, **19**, p. 902-924).
- LERNER (A. B.) et FITZPATRICK (T. B.). — 1950. Biochemistry of melanin formation (*Physiol. Rev.*, **30**, p. 91-126). — 1953. The control of melanogenesis in human pigment cells (Pigment Cell Growth, *Acad. Press, New-York*, p. 319-333).
- LILLIE (F. R.) et WANG (H.). — 1941. Physiology of development of the feather. V. Experimental morphogenesis (*Physiol. Zool.*, **14**, p. 103-133). — 1943. Physiology of development of the feather. VI. The production and analysis of feather-chimære in fowl (*Physiol. Zool.*, **16**, p. 1-21).
- LUBARSCH (O.). — 1931. Ueber Pigmentablagerung und bildung in Gewebekulturen (*Beitr. pathol. Anat. allgem. Pathol.*, **87**, p. 323-330).
- LUTZ (H.) et GOMOT (L.). — 1956. Action de l'organisateur de la glande uropygienne des Oiseaux sur l'ectoderme (*C. R. Soc. Biol.*, **150**, p. 2055-2056).
- MASON (H. S.). — 1953. The structure of melanins. (Pigment Cell Growth *Acad. Press, New-York*, p. 277-300). — 1956. Structures and functions of the phenolase complex (*Nature*, **177**, p. 79-81).
- MORBECK (F. E.) et SAUNDERS (J. W., Jr.). — 1950. The effect of tyrosine on the pigmentation of embryonic chick skin cultured *in vitro* (*Anat. Rec.*, **108**, p. 581). — 1951. The effect of tyrosine on the pigmentation of embryonic chick skin cultured on synthetic media (*Anat. Rec.*, **109**, p. 327).
- MOSCONA (A.). — 1952. Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos (*Exp. Cell Res.*, **3**, p. 535-539).
- MOSCONA (A.) et MOSCONA (H.). — 1952. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo (*J. Anat.*, **86**, p. 287-301).
- RAPER (H. S.). — 1932. Tyrosinase (*Ergebn. Enzymf.*, **1**, p. 270-279).
- RAPER (H. S.) et PUGH (C. E. M.). — 1927. The action of tyrosinase on phenols with some observations on the classification of oxidases (*Biochem. J.*, **21**, p. 1370-1383).
- RAWLES (M. E.). — 1940. The development of melanophores from embryonic mouse tissues grown in the coelom of chick embryos (*Proc. nat. Acad. Sci.*, **26**, p. 673-680). — 1944. The migration of melanoblasts after hatching into pigment-free skin grafts of the common fowl (*Physiol. Zool.*, **17**, p. 167-183). — 1945. Behaviour of melanoblasts derived from the coelomic lining in interbreed grafts of wing skin (*Physiol. Zool.*, **18**, p. 1-16). — 1948. Origin of melanophores and their role in the development of color patterns in Vertebrates (*Physiol. Rev.*, **28**, p. 383-408).
- RAYNAUD (A.) et RAYNAUD (J.). — 1957. Sur les modifications précoces apportées par l'hormone œstrogène dans la structure des ébauches mammaires des fœtus de souris (*Bull. Soc. zool. Fr.*, **82**, p. 204-222).
- RIS (H.). — 1941. An experimental study of the origin of melanophores in birds (*Physiol. Zool.*, **14**, p. 48-66).
- ROSSI (F.) et BORGHESE (E.). — 1935 a. Recherches sur les cultures *in vitro* du duvet des embryons de poulet (*C. R. Assoc. Anat.*, **30**, p. 440-443). — 1935 b. Sur le comportement des plumes embryonnaires cultivées *in vitro* (*Arch. Anat. microsc.*, **31**, p. 459-478).

- SAUNDERS (J. W., Jr.). — 1949. Can prospective pigment cells of the chick embryo be identified by means of vital dyes during the course of their migration into the skin and feather germs ? (*Anat. Rec.*, **105**, p. 116-117).
- SAUNDERS (J. W., Jr.), GASSELING (M. T.) et CAIRNS (J. M.). — 1955. Effect of implantation site on the development of an implant in the chick embryo (*Nature*, **175**, p. 673-676).
- SAUNDERS (J. W., Jr.), QUEVEDO (W. C.), PIERRO (L.) et MORBECK (F. E.). — 1955. The effects of tyrosine and phenylalanine on the synthesis of pigment in melanocytes of embryonic chick skin cultured *in vitro* (*J. nat. Cancer Inst.*, **16**, p. 475-488).
- SENGEL (P.). — 1955 a. Influence de certains acides aminés sur la croissance et la pigmentation du germe plumaire de la peau de l'embryon de poulet cultivée sur milieux synthétiques (*C. R. Soc. Biol.*, **109**, p. 1032-1035). — 1955 b. Influence de la tyrosine sur la pigmentation des germes plumaires de la peau de l'embryon de poulet cultivée *in vitro* (*C. R. Soc. Biol.*, **149**, p. 1479-1482). — 1956. Différenciation *in vitro* des germes plumaires de l'embryon de poulet (*C. R. Soc. Biol.*, **150**, p. 2057-2059). — 1957 a. Analyse expérimentale du développement *in vitro* des germes plumaires de l'embryon de poulet (*Experientia*, **13**, p. 177-182). — 1957 b. Analyse en culture *in vitro* de l'activité du derme et de l'épiderme au cours de la croissance du germe plumaire de l'embryon de poulet (*Bull. Soc. zool. Fr.*, **82**, p. 233-238).
- SPRATT (N. T.). — 1949. Nutritional requirements of the early chick embryo. I. The utilization of carbohydrate substrates (*J. exp. Zool.*, **110**, p. 273-298).
- STENGER-HAFFEN (K.). — 1957. Étude des besoins nutritifs des gonades embryonnaires d'Oiseau cultivées en milieux synthétiques (*Arch. Anat. micr. Morphol. exp.*, **46**, p. 521-607).
- STUDITSKY (A. N.). — 1937. Die Entwicklung der embryonalen Zahnpulpa in den Transplantaten in der Chorio-Allantois (*Anat. Anz.*, **83**, p. 304-310).
- SZABÓ (G.). — 1954. Studies on the cultivation of teeth *in vitro* (*J. Anat.*, **88**, p. 31-44).
- TRAUB (E. F.) et SPOOR (H. J.). — 1953. Melanin and tyrosinase association in normal and pathological skin pigmentation. (Pigment Cell Growth, *Acad. Press, New-York*, p. 211-219).
- TRINKAUS (J. P.) et GROVES (P. W.). — 1955. Differentiation in culture of mixed aggregates of dissociated tissue cells (*Proc. nat. Acad. Sci.*, **41**, p. 785-795).
- TWITTY (V. C.) et NIU (M. C.). — 1954. The motivation of cell migration studied by isolation of embryonic pigment cells singly and in small groups *in vitro* (*J. exp. Zool.*, **125**, p. 541-573).
- WANG (H.). — 1943. The morphogenetic functions of the epidermal and dermal components of the papilla in feather regeneration (*Physiol. Zool.*, **16**, p. 325-349). — 1944. Interbreed transplantation of definitive papillæ as a means of analysing feather pigmentation in fowl (*J. exp. Zool.*, **96**, p. 103-127).
- WATTERSON (R. L.). — 1942. The morphogenesis of down feathers with special reference to the developmental history of melanophores (*Physiol. Zool.*, **15**, p. 234-259).
- WEISSENFELS (N.). — 1956. Licht-, phasenkontrast- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung der Propigmentgranula in Melanoblastenkulturen (*Z. Zellf. mikr. Anat.*, **45**, p. 60-73).
- WHITE (R. F.) et EASTLICK (H. L.). — 1953. The development of melanophores in the down feathers and skin of the Silkie fowl (*Poultry Sci.*, **32**, p. 235-247).
- WILLIER (B. H.). — 1941. An analysis of feather color pattern produced by grafting melanophores during embryonic development (*Amer. Nat.*, **75**, p. 136-146). — 1942. The control of hair and feather pigment as revealed by grafting melanophores in the embryo (*Ann. Surg.*, **116**, p. 598-603). — 1952. Cells, feathers and colors (*Bios*, **23**, p. 109-125). — 1953. Basic mechanisms in the differentiation of pigment cells (*J. Embryol. exp. Morphol.*, **1**, p. 297-299).
- WILLIER (B. H.) et RAWLES (M. E.). — 1938. Feather characterization as studied in host-graft combinations between chick embryos of different breeds (*Proc. nat. Acad. Sci.*, **24**, p. 446-452). — 1942. The control of feather color pattern by melanophores

- grafted from one embryo to another of a different breed of fowl (*Physiol. Zoöl.*, **13**, p. 177-199).
- WOLFF (Ém.). — 1957 *a*. Nouvelles recherches sur la culture organotypique de la syrinx d'Oiseau. Culture sur différents milieux naturels et amélioration de ces milieux par des acides aminés (*Arch. Anat. micr. Morphol. exp.*, **46**, p. 1-38). — 1957 *b*. Analyse des besoins nutritifs d'un organe embryonnaire, la syrinx d'Oiseau, cultivé en milieu synthétique (*Arch. Anat. micr. Morphol. exp.*, **46**, p. 407-468).
- WOLFF (Ét.). — 1953. Principe d'une méthode de culture d'organes embryonnaires en milieux synthétiques (*C. R. Soc. Biol.*, **147**, p. 857-861). — 1956. La culture de tumeurs sur des organes embryonnaires explantés *in vitro* (*Bruxelles-Médical*, **36**, p. 2235-2243).
- WOLFF (Ét.) et HAFEN (K.). — 1952. Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro* (*Texas Rep. Biol. Med.*, **10**, p. 463-472).
- WOLFF (Ét.) et KIENY (M.). — 1956. Comparaison des valeurs nutritives de l'extrait embryonnaire et de liquides organiques adultes dans la culture *in vitro* de tibias cartilagineux d'embryon de poulet (*C. R. Acad. Sci.*, **243**, p. 2152-2154).
- ZWILLING (E.). — 1955. Ectoderm-mesoderm relationship in the development of the chick limb bud (*J. exp. Zool.*, **128**, p. 423-442). — 1956 *a*. Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. I. Axis establishment (*J. exp. Zool.*, **132**, p. 157-171). — 1956 *b*. Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. III. Experiments with polydactylous limbs (*J. exp. Zool.*, **132**, p. 219-239).
-

LÉGENDES DES PLANCHES

PLANCHE I.

Fig. 29 à 33. — *Histogenèse et différenciation normales de la peau et des germes plumaires de l'embryon de poulet.*

D, derme ; *E*, assise basale de l'épiderme ; *Ec*, ectoderme unistratifié ; *EP*, ébauche plumaire ; *GE*, gaine épidermique du germe plumaire ; *M*, mésenchyme indifférencié ; *P*, périoderme ; *PD*, pulpe dermique du germe plumaire. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 29. — 5 jours d'incubation ; région dorsale : l'ectoderme à une seule assise de cellules recouvre le mésenchyme indifférencié.

Fig. 30. — 6 jours d'incubation ; peau de la région dorsale : épiderme différencié à deux assises de cellules et derme individualisé (stade 0).

Fig. 31. — 6 jours $3/4$ d'incubation ; peau de la région dorsale : différenciation des ébauches plumaires (stade 1).

Fig. 32. — 7 jours $1/4$ d'incubation ; peau de la région dorsale : début de l'excroissance du jeune germe plumaire (stade 2).

Fig. 33. — 8 jours d'incubation ; peau de la région dorsale : germe plumaire bien différencié (stade 2 avancé).

Fig. 34 et 35. — *Aspect histologique d'un fragment de peau explanté à 7 jours $1/2$ d'incubation et cultivé pendant 27 jours sur le milieu standard. Importante kératinisation.*

K, gaine kératinisée d'un germe plumaire ; *PD*, pulpe dermique d'un germe plumaire.

Fig. 34. — Grossissement : $\times 66$.

Fig. 35. — Grossissement : $\times 280$ (zone encadrée de la fig. 34).

Fig. 36. — *Explant de peau de stade 1 après 3 jours de culture sur le milieu standard.*

Noter l'étrécissement de l'épiderme par rapport au derme. *D*, derme ; *E*, épiderme. Grossissement : $\times 20$.

Fig. 37 à 39. — *Fragments de peau dorsale prélevés dans la région lombaire à différents stades.*

Le trait en pointillé indique la ligne médiodorsale de l'embryon ; il divise en deux parties droite et gauche les ébauches plumaires de la rangée médiane, dans le cas des figures 38 et 39.

Les cadres entrait plein représentent les incisions qui délimitent les explants de peau. *EP*, ébauche plumaire. Grossissement : $\times 9$.

Fig. 37. — Fragment prélevé à 6 jours d'incubation (stade 0).

Fig. 38. — Fragment prélevé à 6 jours $3/4$ d'incubation (stade 1).

Fig. 39. — Fragment prélevé à 7 jours $1/2$ d'incubation (stade 2).

Fig. 40 à 42. — *Fragments de peau dorsale de divers stades cultivés pendant 5 jours sur le milieu standard.*

D, derme ; *E*, épiderme ; *Ri*, rangée de germes plumaires située le long du bord interne de l'explant ; *Rm*, rangée médiane de germes plumaires située sur une ligne divisant le fragment de peau en deux parties droite et gauche sensiblement égales. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 40. — Fragment de peau explanté au stade 0 : contraction de l'épiderme, dissémination du derme à la surface du milieu.

Fig. 41. — Fragment de peau explanté au stade 1 : après le remaniement des éléments dermiques, la rangée médiane de germes plumaires (*Rm*) est la plus développée.

Fig. 42. — Fragment de peau explanté au stade 2 : la rangée de germes plumaires située le long du bord interne (*Ri*) est la plus développée.

Fig. 43. — Germe plumaire d'un fragment de peau explanté au stade 1 et cultivé pendant 8 jours sur le milieu B 1/10. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 44. — Association d'un fragment de peau de stade 0 et de tube neural de 7 jours 1/2 d'incubation (selon le schéma de la figure 6) après 5 jours de culture sur le milieu standard.

Des germes plumaires se sont différenciés (voir le témoin controlatéral, fig. 45). P, peau ; TN, tube neural. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 45. — Témoin controlatéral du fragment de peau, figure 44 : fragment de peau de stade 0 cultivé pendant 5 jours sur le milieu standard, sans tube neural.

D, derme ; E, épiderme très étreûi. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 46 et 47. — Association d'un fragment de peau de stade 0 et de tube neural de 7 jours 1/2 d'incubation tué à la chaleur.

Après 5 jours de culture, la peau a différencié des germes plumaires. GP, germe plumaire ; P, peau ; TNt, tube neural tué.

Fig. 46. — Aspect macroscopique. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 47. — Aspect histologique. Grossissement : $\times 67$.

PLANCHE II.

Fig. 48. — Fragment de peau de stade 0 cultivé pendant 5 jours sur le milieu PA, contenant de l'extrait embryonnaire et du plasma de poulet. Différenciation de germes plumaires (voir témoin controlatéral, figure 53).

D, derme ; E, épiderme. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 49. — Fragment de peau de stade 0 cultivé pendant 5 jours sur le milieu PB, contenant uniquement du plasma de poulet. Différenciation de germes plumaires très nombreux (voir témoin controlatéral, figure 52). Grossissement : $\times 40$.

Fig. 50. — Fragment de peau de stade 0 cultivé pendant 5 jours sur le milieu SA, contenant de l'extrait embryonnaire et du sérum de cheval.

E, épiderme. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 51. — Exemple d'un fragment de peau de stade 0 ayant différencié sur le milieu standard quelques petits germes plumaires (comparer avec la figure 49).

D, derme ; E, épiderme étreûi. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 52. — Témoin controlatéral du fragment de peau, figure 49 : fragment de peau de stade 0 cultivé pendant 5 jours sur le milieu standard.

D, derme ; E, épiderme étreûi. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 53. — Témoin controlatéral du fragment de peau, figure 48 : fragment de peau de stade 0 cultivé pendant 5 jours sur le milieu standard.

D, derme ; E, épiderme étreûi. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 54. — Association d'épiderme de stade 0 et de derme de stade 2 (selon le schéma de la figure 12) après 5 jours de culture sur le milieu standard.

L'explant n'a pas différencié de germes plumaires. D, derme ; E, épiderme. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 55. — Association d'épiderme de stade 0 et de derme de stade 1 (selon le schéma de la figure 11) après 5 jours de culture sur le milieu standard. Différenciation de germes plumaires.

D, derme ; E, épiderme. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 56. — Association d'épiderme de stade 2 et de derme de stade 0 (selon le schéma de la figure 13) après 5 jours de culture sur le milieu standard. Différenciation de nombreux germes plumaires.

D, derme ; E, épiderme. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 57. — *Aspect histologique d'un germe plumaire qui s'est développé après 5 jours de culture sur le milieu standard, dans le cas d'une association d'épiderme de stade 2 et de derme de stade 0 (selon le schéma de la figure 13).*

D, derme ; *Ep*, assise basale de l'épiderme ; *P*, périderme. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 58 à 60. — *Séparation du derme et de l'épiderme par l'action de la trypsine diluée.*

D, derme ; *E*, épiderme ; *Ebd*, ébauche plumaire dermique ; *Ep*, assise basale de l'épiderme ; *GP*, jeune germe plumaire ; *P*, périderme.

Fig. 58. — *Fragment de peau de stade 2 après le passage dans la solution de trypsine ; l'épiderme s'est complètement décollé du derme.* Grossissement : $\times 67$.

Fig. 59. — *Détail d'un fragment de peau de stade 2 après le passage dans la solution de trypsine montrant la séparation parfaite au niveau d'un jeune germe plumaire.* Grossissement : $\times 280$.

Fig. 60. — *Aspect de l'épiderme après la séparation du derme ; il ne reste, sur la face interne de l'épiderme, que quelques débris cellulaires.* Grossissement : $\times 667$.

Fig. 61 à 64. — *Association d'épiderme de stade 2 et de peau entière inversée de stade 1 (selon le schéma de la figure 14) : l'épiderme est déposé avec sa face interne sur la face profonde du derme de la peau.*

D, derme de la peau inversée divisé en deux parties par du mésenchyme lâche lacunaire ; *Eg*, épiderme greffé ; *Ep*, épiderme propre de la peau inversée.

Fig. 61. — *L'association vue par sa face supérieure montrant l'épiderme greffé et ses différenciations plumaires après 5 jours de culture sur le milieu standard.* Grossissement : $\times 40$.

Fig. 62. — *La même association que celle de la figure 61 vue par la face inférieure qui était en contact avec le milieu, montrant les germes propres de la peau inversée : ces germes sont mal formés, car ils étaient écrasés entre l'explant et la surface du milieu.* Grossissement : $\times 40$.

Fig. 63. — *Aspect histologique d'une telle association après 5 jours de culture sur le milieu standard.* Grossissement : $\times 67$.

Fig. 64. — *Détail histologique d'une telle association après 5 jours de culture sur le milieu standard.* Grossissement : $\times 280$.

Fig. 65. — *Association d'épiderme inversé de stade 1 et de derme de stade 1 (selon le schéma de la figure 17) après 5 jours de culture sur le milieu standard.*

Noter les germes plumaires inversés qui ont poussé en s'enfonçant dans le derme. Celui de gauche sur la photographie bute contre le milieu de culture.

D, derme ; *Dn*, derme nécrosé ; *E*, assise basale de l'épiderme ; *M*, emplacement du milieu de culture ; *P*, périderme. Grossissement : $\times 140$.

Fig. 66 et 67. — *Aspect histologique de l'association d'ectoderme inversé de 5 jours d'incubation et de derme de stade 1 (selon le schéma de la figure 15) après 5 jours de culture sur le milieu standard.*

D, derme ; *E*, assise basale de l'épiderme ; *P*, périderme.

Fig. 66. — Grossissement : $\times 280$.

Fig. 67. — Grossissement : $\times 667$ (zone encadrée de la fig. 66).

Fig. 68. — *Aspect histologique de l'épiderme de l'association d'épiderme inversé de stade 0 et de derme de stade 1 (selon le schéma de la figure 16) après 5 jours de culture sur le milieu standard.*

Noter l'allure sphérique des noyaux péridermiques (voir témoin, fig. 69). *D*, derme ; *E*, assise basale de l'épiderme ; *P*, périderme. Grossissement : $\times 667$.

Fig. 69. — *Témoin de l'épiderme, figure 68 : aspect histologique de l'épiderme d'un fragment de peau (association d'épiderme de stade 0 et de derme de stade 1) témoin cultivé pendant 5 jours sur le milieu standard.*

Noter la forme aplatie des noyaux péridermiques.

D, derme ; *E*, assise basale de l'épiderme ; *P*, périderme. Grossissement : $\times 667$.

Fig. 70 et 71. — *Aspects histologiques d'un germe plumaire qui s'est différencié après 5 jours de culture sur le milieu standard, dans le cas de l'association d'épiderme inversé de stade 1 et de derme de stade 1 (selon le schéma de la figure 17).*

Le germe plumaire est inversé, il pousse en s'enfonçant dans le derme vers le milieu de culture qui se trouve au bas des photographies. Les deux photographies représentent deux coupes du même germe plumaire séparées l'une de l'autre par 35 microns.

D, derme ; *Dn*, derme nécrosé ou en voie de nécrose ; *E*, assise basale de l'épiderme ; *I*, interstice dans l'épiderme ; *M*, emplacement du milieu de culture ; *P*, périderme. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 70. — Remarquer la disposition des deux assises de l'épiderme du germe inversé qui est restée celle du départ, périderme sur la face convexe du germe.

Fig. 71. — Remarquer l'interruption (*I*) dans la palissade épidermique. Cet interstice est une voie de pénétration possible des cellules dermiques à l'intérieur du germe plumaire.

PLANCHE III.

Fig. 72. — *Association d'épiderme de stade 1 et de derme de stade 1, l'épiderme étant tourné de 180° par rapport au derme (selon le schéma de la figure 18 A), après 5 jours de culture sur le milieu standard.*

La flèche en pointillé pointe vers le bord céphalique du fragment de derme ; la flèche en trait plein pointe vers le bord céphalique de l'épiderme. Remarquer que la majorité des germes sont inclinés vers le bord caudal de l'épiderme. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 73. — *Association témoin d'épiderme de stade 1 et de derme de stade 1, sans rotation de l'épiderme (selon le schéma de la figure 18 B), après 5 jours de culture sur le milieu standard.*

Les flèches pointent vers le bord céphalique du fragment de peau. Remarquer l'inclinaison des germes plumaires vers le bord caudal de l'explant. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 74. — *Aspect histologique de l'épiderme de la crête de 12 jours d'incubation.*

E, assise basale de l'épiderme ; *P*, périderme. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 75. — *Association d'épiderme de stade 2 et de mésenchyme sous-cutané après 5 jours de culture sur le milieu standard. Différenciation de germes plumaires. Grossissement : $\times 40$.*

Fig. 76. — *Association d'épiderme de la crête de 12 jours et de derme dorsal de stade 1 (selon le schéma de la figure 19) après 5 jours de culture sur le milieu standard. Différenciation de germes plumaires. Grossissement : $\times 40$.*

Fig. 77. — *Association d'épiderme de stade 0 et de derme de stade 1, l'épiderme étant tourné de 90° par rapport au derme, après 5 jours de culture sur le milieu standard.*

Les flèches pointent vers le bord céphalique du derme (en pointillé) et de l'épiderme (en trait plein). Remarquer l'inclinaison des germes plumaires vers le bord caudal du fragment d'épiderme. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 78. — *Association d'épiderme dorsal de stade 2 et de mésenchyme mésonéphrétique de 7 jours d'incubation après 5 jours de culture sur le milieu standard.*

E, épiderme dorsal ; *Ex*, petite excroissance épidermique ; *MM*, mésenchyme mésonéphrétique. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 79. — *Association d'épiderme de la face latérale de la crête de 12 jours d'incubation et de derme dorsal de stade 1 (selon le schéma de la figure 19) après 5 jours de culture sur le milieu standard. Aspect histologique d'un germe plumaire ayant poussé sur une telle association.*

D, derme ; *Ek*, épiderme en voie de kératinisation ; *Pk*, périderme dont les cellules sont chargées de grains de kératohyaline. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 80. — *Association d'épiderme dorsal de stade 2 et de mésenchyme pulmonaire de 7 jours d'incubation après 5 jours de culture sur le milieu standard.*

B, épithélium bronchique en continuité avec l'épiderme dorsal ; *E*, épiderme dorsal ; *Ex*, petite excroissance épidermique ; *MP*, mésenchyme pulmonaire. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 81. — Association d'épiderme de la région tarso-métatarsienne de 12 jours d'incubation et de derme dorsal de stade 1 (selon le schéma de la figure 20) après 5 jours de culture sur le milieu standard. Différenciation de germes plumaires (comparer avec la figure 88 ; voir aspect histologique, figure 87). Grossissement : $\times 40$.

Fig. 82. — Aspect macroscopique de la région tarso-métatarsienne antérieure d'un embryon de 12 jours au moment du prélèvement de l'épiderme qui entre dans l'association représentée figure 81.

Remarquer les ébauches des écailles (voir aspect histologique, figure 83). Grossissement : $\times 9$.

Fig. 83. — Aspect histologique de l'épiderme tarso-métatarsien de 12 jours d'incubation.

E, assise basale de l'épiderme ; *P*, périderme. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 84. — Aspect histologique de l'épiderme scutellaire d'un fragment de peau de la région tarso-métatarsienne prélevé à 12 jours d'incubation et cultivé pendant 5 jours sur le milieu standard.

Ek, épiderme en voie de kératinisation ; *Pk*, périderme chargé de grains de kératohyaline. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 85. — Association d'épiderme dorsal de stade 1 et de derme de la région tarso-métatarsienne de 13 jours d'incubation (selon le schéma de la figure 22) après 5 jours de culture sur le milieu standard. Différenciation d'écailles (voir aspect histologique, figures 89 et 91). Grossissement : $\times 40$.

Fig. 86. — Exemple d'une association d'épiderme dorsal de stade 2 et de derme tarso-métatarsien de 12 jours d'incubation ayant fourni, après 5 jours de culture sur le milieu standard, à la fois des germes plumaires et des écailles. Grossissement : $\times 40$.

Fig. 87. — Aspect histologique (coupe transversale) d'un germe plumaire qui s'est différencié après 5 jours de culture sur le milieu standard, dans le cas de l'association d'épiderme tarso-métatarsien de 12 jours d'incubation et de derme dorsal de stade 1 (selon le schéma de la figure 20).

D, derme ; *Ek*, épiderme en voie de kératinisation ; *Pk*, périderme chargé de grains de kératohyaline. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 88. — Explant de peau tarso-métatarsienne prélevé à 12 jours d'incubation et cultivé pendant 5 jours sur le milieu standard. Différenciation d'écailles (voir aspect histologique, figures 84 et 90). Grossissement : $\times 40$.

Fig. 89. — Aspect histologique d'une écaille qui s'est différenciée après 5 jours de culture sur le milieu standard, dans le cas d'une association d'épiderme dorsal de stade 1 et de derme tarso-métatarsien de 13 jours d'incubation (selon le schéma de la figure 22).

D, derme ; *E*, assise basale de l'épiderme ; *Ek*, couches superficielles de l'épiderme en voie de kératinisation ; *Pk*, périderme fortement épaissi et chargé de granulations éosinophiles. Grossissement : $\times 280$.

Fig. 90. — Épiderme d'une écaille d'un fragment de peau tarso-métatarsienne prélevé à 13 jours d'incubation et cultivé pendant 5 jours sur le milieu standard.

Remarquer la même structure histologique de l'épiderme que dans les figures 89 et 91.

Ek, épiderme en voie de kératinisation ; *Pk*, périderme chargé de granulations fortement éosinophiles. Grossissement : $\times 667$.

Fig. 91. — Fort grossissement de l'extrémité distale de l'écaille représentée dans la figure 89. Le périderme commence à se détacher de l'épiderme en voie de kératinisation.

E, assise basale de l'épiderme ; *Ek*, épiderme en voie de kératinisation ; *Pk*, périderme chargé de granulations éosinophiles. Grossissement : $\times 667$.

PLANCHE IV.

Fig. 92 à 94. — Trois stades de la pigmentation normale des germes plumaires de la région dorsale de l'embryon de poulet de la race Noire d'Alsace. Grossissement : $\times 233$.

Fig. 92. — Germe plumaire de 0,02 mm de long comptant une vingtaine de mélanocytes différenciés.

Fig. 93. — Germe plumaire de 0,1 mm de long comptant une centaine de mélanocytes

Fig. 94. — Germe plumaire de 0,3 mm de long comptant environ 500 mélanocytes.

Fig. 95. — *Différenciation du pigment d'un fragment de peau de la race Noire d'Alsace explanté sur le milieu standard.*

Au moment de l'explantation, les germes plumaires comptaient chacun environ 12 mélanocytes (voir fig. 92). Aspect d'un germe plumaire après 5 jours de culture : il mesure 0,49 mm et compte plus de 1 500 mélanocytes. Grossissement : $\times 233$.

Fig. 96. — *Germes plumaires d'un fragment de peau de la race Noire d'Alsace après 5 jours de culture sur le milieu standard (comparer à la figure 97).* Grossissement : $\times 67$.

Fig. 97. — *Témoin controlatéral du fragment, figure 96 : germes plumaires d'un fragment de peau de la race Noire d'Alsace cultivé pendant 5 jours sur le milieu T.* Grossissement : $\times 67$.

Fig. 98. — *Fragment de peau de la race Noire d'Alsace cultivé pendant 5 jours sur le milieu B 1/2 : inhibition de la mélanogenèse (comparer à la figure 99).* Grossissement : $\times 28$.

Fig. 99. — *Témoin controlatéral du fragment, figure 98 : fragment de peau de la race Noire d'Alsace cultivé pendant 5 jours sur le milieu T : mélanogenèse normale.* Grossissement : $\times 28$.

Fig. 100. — *Fragment de peau de la race Noire d'Alsace cultivé pendant 5 jours sur le milieu C 1/10 (cystéine) : inhibition de la mélanogenèse (comparer à la fig. 101).* Grossissement : $\times 28$.

Fig. 101. — *Témoin controlatéral du fragment, figure 100 : fragment de peau de la race Noire d'Alsace cultivé pendant 5 jours sur le milieu T : mélanogenèse normale.* Grossissement : $\times 28$.

Fig. 102. — *Fragment de peau de la race Noire d'Alsace cultivé pendant 5 jours sur le milieu A 1/6 (arginine) : augmentation de la pigmentation (comparer à la figure 105).* Grossissement : $\times 28$.

Fig. 103. — *Témoin controlatéral du fragment, figure 102 : fragment de peau de la race Noire d'Alsace cultivé pendant 5 jours sur le milieu T : pigmentation moins intense qu'en la présence d'arginine (fig. 102).* Grossissement : $\times 28$.

Fig. 104. — *Témoin controlatéral du fragment, figure 105 : fragment de peau de la race Noire d'Alsace cultivé pendant 5 jours sur le milieu T : pigmentation normale.* Grossissement : $\times 28$.

Fig. 105. — *Fragment de peau de la race Noire d'Alsace cultivé pendant 5 jours sur le milieu Ty (tyrosine) : exaltation de la pigmentation (comparer à la figure 104).* Grossissement : $\times 28$.

Fig. 106. — *Témoin controlatéral du fragment, figures 107 et 108 : fragment de peau de la race Leghorn blanche cultivé pendant 5 jours sur le milieu standard : absence totale de mélanocytes.* Grossissement : $\times 28$.

Fig. 107. — *Fragment de peau de la race Leghorn blanche, marqué au bleu de Nil au moment de l'explantation et cultivé pendant 5 jours sur le milieu standard (selon le schéma de la figure 28). La marque colorée a disparu ; de nombreux mélanocytes se sont différenciés dans la zone marquée au bleu de Nil (voir détail de la zone marquée, figure 108 ; comparer à la figure 106).* Grossissement : $\times 28$.

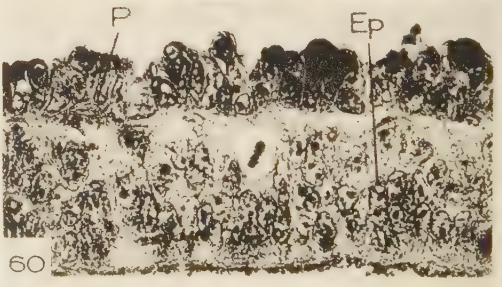
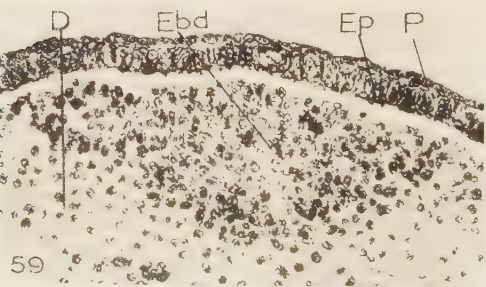
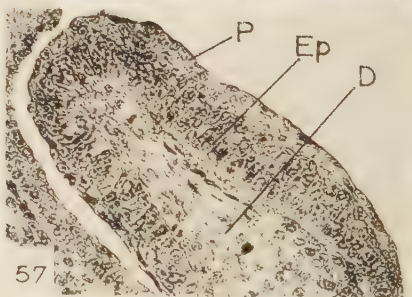
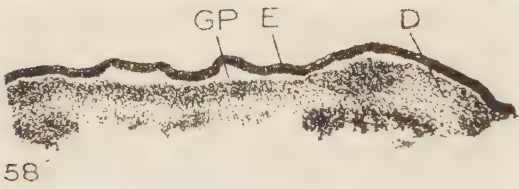
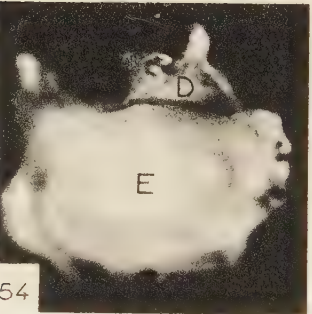
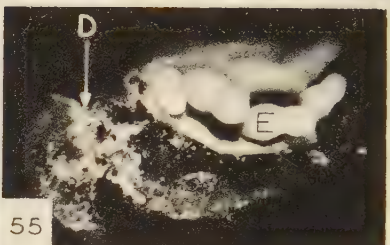
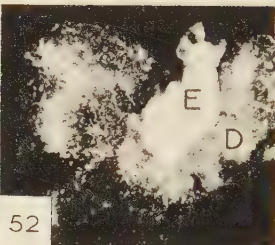
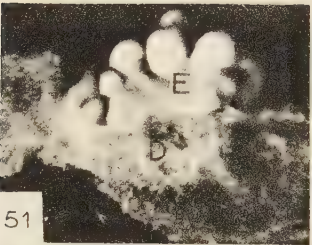
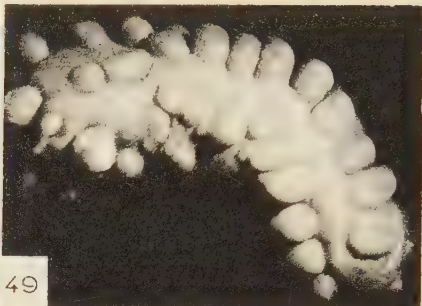
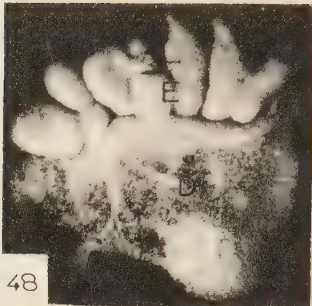
Fig. 108. — *Détail de la zone marquée au bleu de Nil du fragment, figure 107. Observer les nombreux mélanocytes branchus.* Grossissement : $\times 80$.

Fig. 109. — *Témoin controlatéral du germe plumaire, figure 110 : germe plumaire d'un fragment de peau de la race Leghorn blanche cultivé pendant 5 jours sur le milieu B 1/2 : absence totale de pigment.* Grossissement : $\times 200$.

Fig. 110. — *Germe plumaire d'un fragment de peau de la race Leghorn blanche cultivé pendant 5 jours sur le milieu B 1/2 + Ty : la tyrosine provoque la différenciation de nombreux mélanocytes chargés de mélanine (comparer à la figure 109) (voir aspect histologique, figure 111).* M, mélanocyte. Grossissement : $\times 200$.

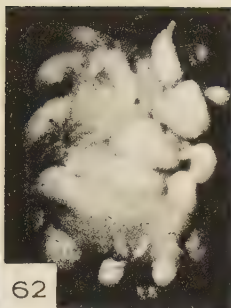
Fig. 111. — *Aspect histologique d'un germe plumaire d'un fragment de peau de la race Leghorn blanche cultivé pendant 5 jours sur le milieu B 1/2 + Ty.*

Noter les nombreux mélanocytes en voie de déposer leur pigment dans les cellules épidermiques. Md, mélanocyte se déchargeant de sa mélanine dans les cellules épidermiques. Grossissement : $\times 280$.

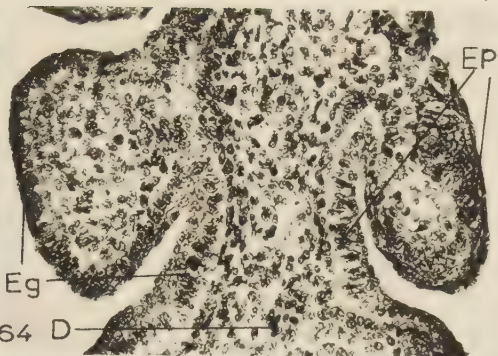




61

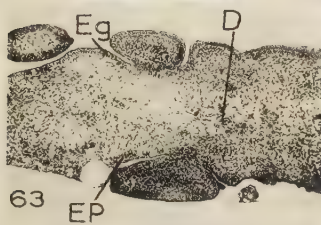


62

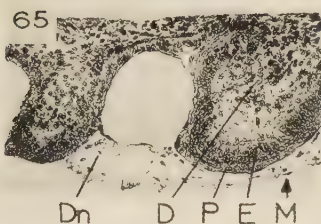


Eg

64 D



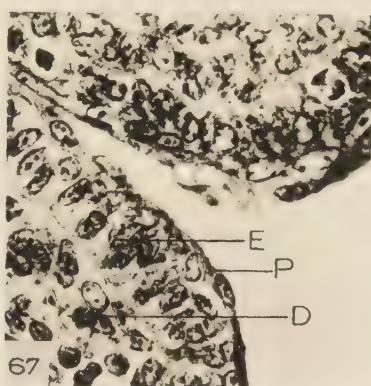
63



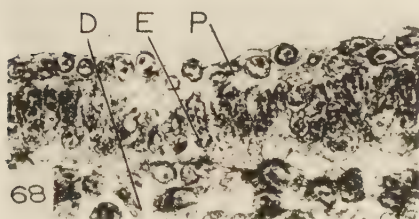
65



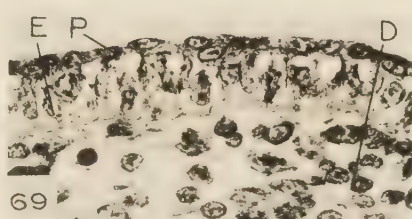
66



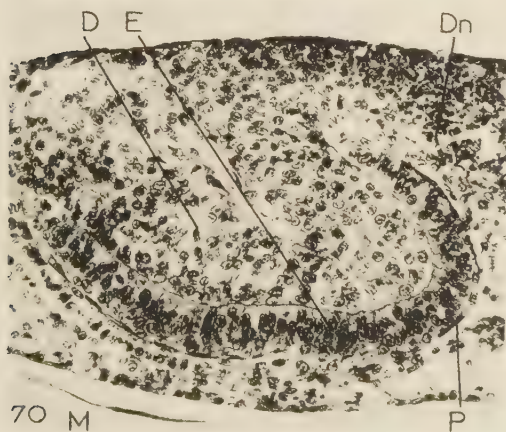
67



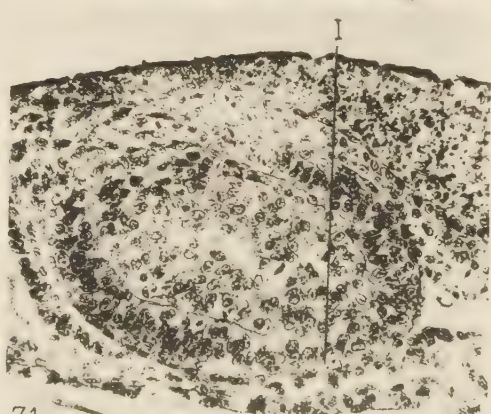
68



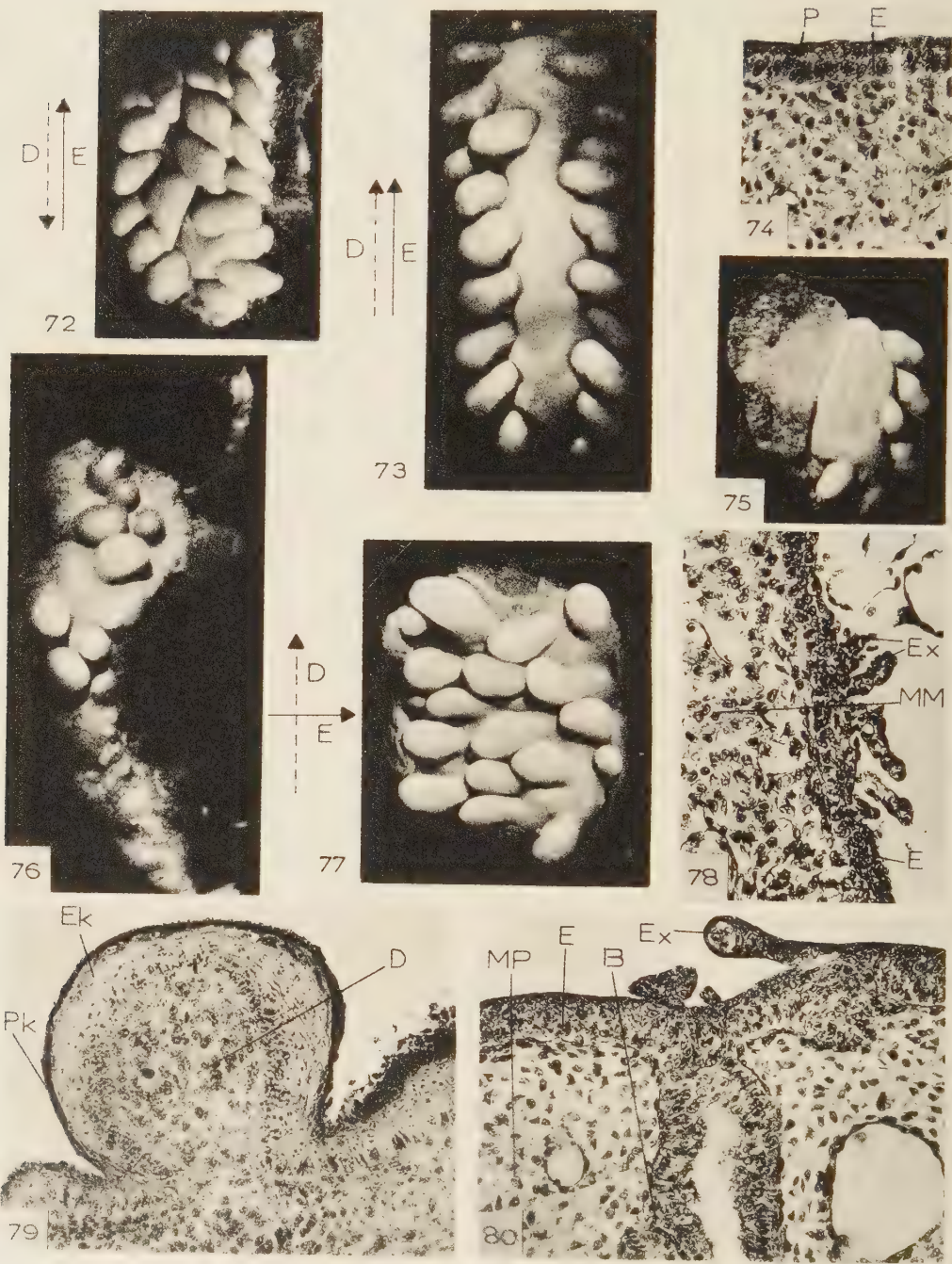
69

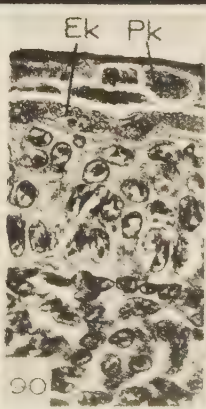
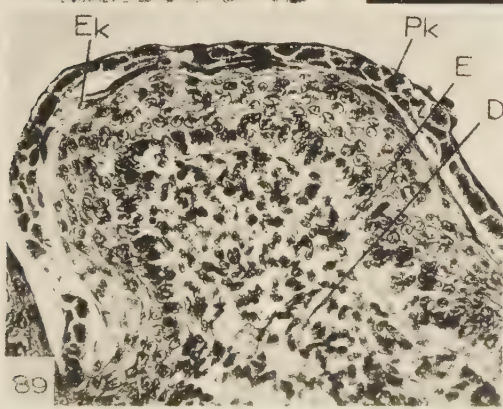
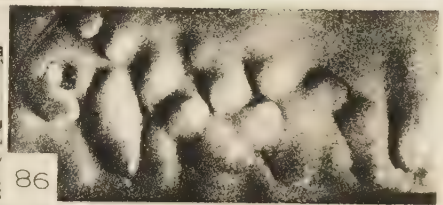
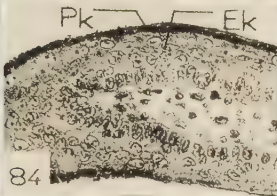
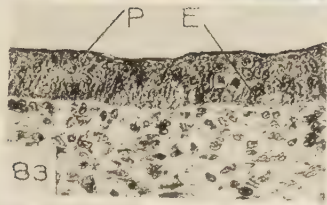
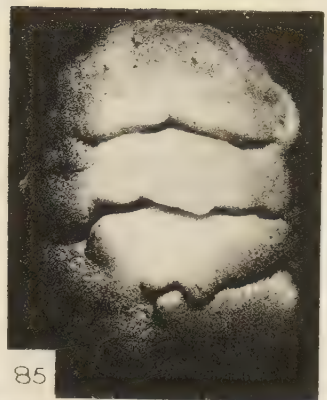


70 M



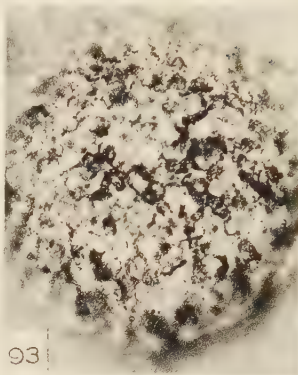
71



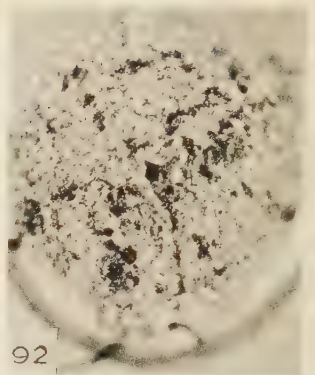




94



93



92



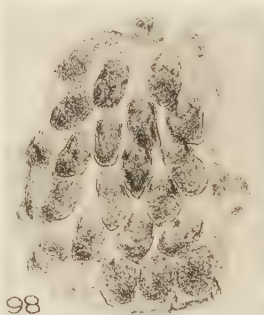
96



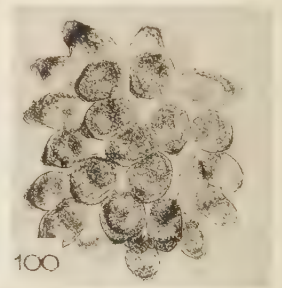
97



95



98



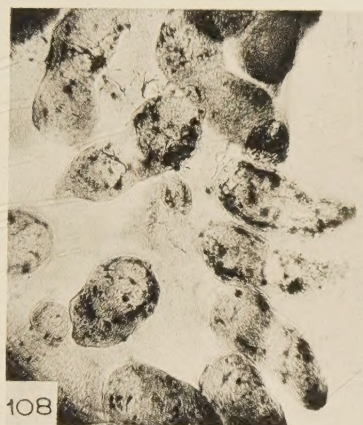
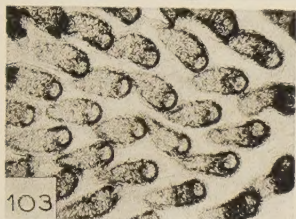
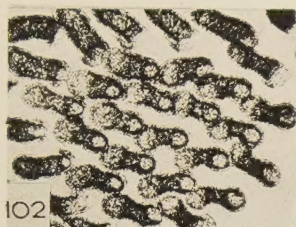
100



99



101



DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LE CHONDRIOME ET SON ULTRASTRUCTURE

Vu et approuvé :

Paris, le 29 Avril 1958.

Le Doyen de la Faculté des Sciences :

J. PÉRÈS

Vu

et Permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie
de Paris**

Jean SARRAILH

